

Eturauhassyövän mitokondriaaliset haploryhmät suomalaisessa väestössä

Pro gradu -tutkielma
Tampereen yliopisto
Lääketieteellisen teknologian instituutti
Huhtikuu 2008
Niina Tero

KIITOKSET

Tämä *Pro gradu* -tutkielma tehtiin Tampereen yliopiston Lääketieteellisen teknologian instituutissa (IMT). Tutkimuksen kokeellinen osa suoritettiin Johanna Schleutkerin johtamassa Eturauhassyöpägenetiikan-tutkimusryhmässä. Kiitänkin ohjaajaani Johanna Schleutkeria tutkimuksen mahdollistamisesta, asiantuntevista ohjeista ja neuvoista työn eri vaiheissa sekä tutkielman tarkastamisesta. Kiitokset kuuluvat myös Henna Mattilalle, Sanna Siltaselle ja Tiina Walhforsille asiantuntevasta ohjeistuksesta tutkimuksen eri työvaiheissa sekä Linda Enrothille neuvoista laboratoriotyöskentelyssä. Lisäksi esitän kiitokseni Jarkko Isotalolle avusta ja neuvoista tilastollisten analyysien teossa.

Haluan esittää kiitokset myös Kia Minkkiselle oman tutkimuksensa tietojen luovuttamisesta sekä avusta haploryhmäanalyyseissä. Anja Roviota haluan kiittää neuvoista tutkimuksen teossa. Lisäksi haluan kiittää professori Markku Kulomaata vinkeistä ja neuvoista työn kirjoitusvaiheessa. Kiitos myös Merja Heleniukselle tutkielman tarkastamisesta.

Lopuksi haluan osoittaa kiitokset perheelleni, myös edesmenneelle Isälleni (16.10.1953–27.4.2006), kaikesta opiskelujeni aikana saamasta tuesta ja kannustuksesta. Kiitän myös ystäviäni neuvoista ja kannustuksesta, joita ilman tämän tutkielman tekeminen ei olisi ollut mahdollista.

Tampere, Huhtikuu 2008

Niina Tero

PRO GRADU -TUTKIELMA

Paikka:	TAMPEREEN YLIOPISTO Lääketieteellinen tiedekunta Lääketieteellisen teknologian instituutti (IMT)
Tekijä:	TERO, NIINA KAROLIINA
Otsikko:	Eturauhassyövän mitokondriaaliset haploryhmät suomalaisessa väestössä
Sivumäärä:	79 s.
Ohjaaja:	Prof. Johanna Schleutker
Tarkastajat:	Prof. Johanna Schleutker ja FT Merja Helenius
Aika:	Huhtikuu 2008

TIIVISTELMÄ

Tutkimuksen tausta ja tavoitteet: Eturauhassyöpä on maailmanlaajuisesti miesten yleisin syöpä. Huolimatta valtavista tutkimuspanostuksista edelleen on melko vähän tietoa syistä, jotka johtavat eturauhassyövän syntyyn, varsinkin perinnöllisen eturauhassyövän kohdalla. Tiedetään kuitenkin, että perimä on yksi selkeimmistä riskitekijöistä. Epidemiologissa tutkimuksissa on voitu osoittaa, että suvussa useat eturauhassyöpään sairastuneet nostavat selkeästi vielä terveiden miesten riskiä sairastua. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää mitokondriaalisen DNA:n ja erityisesti haploryhmien osuutta eturauhassyövän riskitekijänä. Toisin sanoen, voiko tietty haploryhmä altistaa kohonneelle eturauhassyöpäriskille suomalaisessa väestössä.

Tutkimusmenetelmät: Näytteinä käytettiin perhetaustaisia ja satunnaisesti valittuja eturauhassyöpään sairastuneita miehiä sekä kontrollipotilaina Suomen punaisen ristin verenluovuttajia. Kaikkien näytteiden mitokondriaalinen DNA sekvensoitiin ABI Prism 3100 DNA -sekvensaattorilla alueelle suunnitelluilla alukkeilla. Sekvensoinnista saadun datan avulla kullekin näytteelle määritettiin haploryhmät ja laskettiin kunkin haploryhmän assosiaatio eturauhassyöpään.

Tutkimustulokset: Tutkimuksessa saadun sekvensointidatan perusteella voidaan todeta, että tilastollisen merkitsevyyden kannalta syöpäpotilaiden kohdalla kontrolliryhmää yleisempiä olivat haploryhmät I ja TJ*, kun taas haploryhmä H oli yleisempi kontrolliryhmässä verrattuna syöpäpotilaiden näytteisiin. Sekvensoinnin myötä löytyi myös muutoskohta C7996A kaikista näytteistä, niin syöpä- kuin kontrolliryhmässä.

Johtopäätökset: Tässä työssä saadut tulokset osoittavat, että suomalaisväestössä eturauhassyövän riskitekijänä olisivat haploryhmät I ja TJ*, riippumatta siitä sairastuuko eturauhassyöpään perhetaustaisesti vai satunnaisesti. Haploryhmää H sen sijaan voidaan pitää potentiaalisena suojaavana tekijänä eturauhassyöpää vastaan, etenkin eturauhassyövässä perhetaustaisesti positiivisten miesten kohdalla. Uutta varianttia C7996A sytokromioksidaasi II-alayksikössä voidaan pitää todennäköisesti normaalina sekvenssinä suomalaisten mitokondriaalisessa DNA:ssa.

MASTER'S THESIS

Place: UNIVERSITY OF TAMPERE
Faculty of Medicine
Institute of Medical Technology (IMT)

Author: TERO, NIINA KAROLIINA

Title: Mitochondrial haplogroups in prostate cancer in Finland

Pages: 79 pp.

Supervisor: Professor Johanna Schleutker

Reviewers: Professor Johanna Schleutker and Dr. Merja Helenius (PhD)

Date: April 2008

ABSTRACT

Background and Aims: Prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer in men worldwide. Etiological factors are still poorly known but one of the most definitive risk factors is positive family history. Epidemiological studies have shown that many affected relatives are associated with high risk of prostate cancer to healthy men. Aim of this study was to determine if mitochondrial DNA and especially mitochondrial haplogroups are involved in prostate cancer as a risk factor. In other words, could some certain haplogroup predispose to prostate cancer risk of in the Finnish population.

Methods: Analysed samples were both familial and sporadic prostate cancer cases and anonymous control samples from the Finnish Red Cross blood donors. Mitochondrial DNA from all samples was sequenced using specially designed primers and ABI Prism 3100 DNA analyser. Haplogroups for all samples were determined based on the data that was received from sequencing analyses. The association between each haplogroup and prostate cancer was counted.

Results: The sequencing data that was received in this study showed that haplogroups I and TJ* were more frequent in cancer patients than in controls compared to statistical significance. On the other hand haplogroup H was more frequent in controls than in cancer patients. Alteration point C7996A was found along with sequencing from all samples including controls.

Conclusions: Results from the study suggest that haplogroups I and TJ* are predisposing susceptibility factors to prostate cancer in the Finnish population regardless of whether patient has familial or sporadic prostate cancer. Instead haplogroup H could be considered as potential protective factor against prostate cancer, especially in men, who have positive family history for prostate cancer. Alteration C7996A in cytochrome oxidase subunit II is more likely a normal sequence than a site of variation in mitochondrial DNA in the Finnish.

SISÄLLYSLUETTELO

<i>Lyhenteet ja vierasperäiset sanat</i>	6
1 JOHDANTO	7
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	9
2.1 Eturauhanen	9
2.2 Eturauhassyöpä	10
2.2.1 Eturauhassyövän esiintyvyys	10
2.2.2 Riskitekijät eturauhassyövässä.....	11
2.2.3 Perinnöllinen eturauhassyöpä.....	12
2.2.3.1 Perinnölliselle eturauhassyöväälle altistavat geenit	12
2.2.3.2 Perinnöllisen eturauhassyövän yhteys muihin syöpiin	14
2.3 Mitokondrio	14
2.3.1 Mitokondriaalinen DNA	16
2.3.2 Mitokondriaalisen DNA:n periytyminen	19
2.3.3 Energiantuotanto mitokondrioissa.....	20
2.3.3.1 Oksidatiivinen fosforylaatio	21
2.4 Häiriöt mitokondriaalisessa DNA:ssa	23
2.4.1 Mitokondriaalinen DNA & vanheneminen.....	26
2.4.2 Mitokondriaalisen DNA:n mutaatiot & syöpä	28
2.4.2.1 mtDNA:n mutaatiot & eturauhassyöpä.....	31
2.4.2.1.1 Eturauhassyövässä raportoiduista mtDNA-mutaatioista.....	32
2.5 Mitokondriaaliset haploryhmät	34
2.5.1 Eurooppalaisten haploryhmien identifiointi.....	35
2.5.2 Mitokondriaaliset haploryhmät Suomessa.....	37
3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	38
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	39
4.1 Näytteet	39
4.2 Mitokondriaalisen DNA:n monistaminen	40
4.3 PCR-tuotteiden puhdistus	41
4.4 Sekvensointi-PCR	42
4.5 Sekvensointireaktioiden puhdistus etanolisaostuksella	42
4.6 Sekvensointidatan analysointi	43
4.7 Analysointia sekvensointitulosten pohjalta	43
4.7.1 Haploklusterimääritys	44
4.7.2 Haploryhmämääritys	45
4.8 Tilastolliset analyysit	47
5 TULOKSET	49
5.1 Haploklusterianalyysi	49

5.2 Haploryhmäanalyysi	51
5.3 Tilastolliset analyysit tuloksista	56
5.4 Sekvensoitaessa löytynyt muutoskohta C7996A	60
6 POHDINTA	62
6.1 Tutkimuksen eri työvaiheista.....	62
6.2 Tässä työssä saatujen tulosten tarkastelua.....	64
6.3 Eturauhassyöpään liitetyn mtDNA-tutkimuksen tulevaisuus	66
7 JOHTOPÄÄTÖKSET	69
LÄHDELUETTELO	71

Lyhenteet ja vierasperäiset sanat

ADP	adenosiinidifosfaatti
ATP	adenosiinitrifosfaatti
bp	emäspari (base pair)
CO-I	sytokromioksidaasi alayksikkö-I
CO-II	sytokromioksidaasi alayksikkö-II
CRS	Cambridgen viitesekvenssi (The human mtDNA Cambridge reference sequence)
D-loop	mtDNA:n ei-koodaava alue (non-coding displacement loop)
DNA	deoksiribonukleiinihappo
HVS-I	ensimmäinen hypervaihteleva alue (segmentti) mtDNA:n ei-koodaavalla alueella (first hypervariable segment)
HVS-II	toinen hypervaihteleva alue (segmentti) mtDNA:n ei-koodaavalla alueella (second hypervariable segment)
<i>in vivo</i>	elävässä elimistössä/solussa
kompleksi I	NADH-dehydrogenaasi
kompleksi II	sukkinaattidehydrogenaasi
kompleksi III	sytokromi bc ₁ -kompleksi
kompleksi IV	sytokromioksidaasi (myös sytokromi c -oksidaasi)
kompleksi V	ATP-syntaasi
mRNA	lähetti-RNA (messenger RNA)
mtDNA	mitokondriaalinen DNA
nt	nukleotidi (nucleotid)
OR	ristitulosuhde (odds ratio)
PCR	polymeraasiketjureaktio (polymerase chain reaction)
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNA	ribonukleiinihappo
rRNA	ribosomaalinen RNA (ribosomal RNA)
SNP	yhden nukleotidin monimuotoisuus (polymorfia) (single nucleotid polymorphism)
tRNA	siirtäjä-RNA (transfer RNA)

1 JOHDANTO

Eturauhassyöpä on miesten yleisin syöpä Suomessa ja sen ilmaantuvuus näyttäisi nousevan vuosi vuodelta. Eturauhassyövän esiintymistiheyden tiedetään olevan Suomessa yksi korkeimmista maailmalla (97,8/100 000). Vuonna 2005 Suomessa sairastui 5322 miestä eturauhassyöpään ja heidän laskettu suhteellinen elossaololuku (%) viiden vuoden jälkeen on 89. (Suomen syöpärekisteri, Finnish Cancer Registry, 2008.) Keuhkosityövän jälkeen eturauhassyöpä aiheuttaa Suomessa eniten syöpäkuolemia miehillä. Eturauhassyöpä syntyy, kun eturauhasessa olevat epiteelisolut alkavat muuttua pahanlaatuisiksi syöpäsoluiksi. Syitä syövän kehittymiselle ei vielä tarkasti tunneta, mutta tiedetään, että korkea ikä (sairastuneiden keski-ikä n. 71 vuotta) ja perintötekijät nostavat riskiä sairastua eturauhassyöpään. Perinnöllistä eturauhassyöpää esiintyy väestössämme noin 5 prosenttia (%) ja perheittäin esiintyvää on noin 20 % tapauksista (Käypä hoito, 2007). Epidemiologisten kaksostutkimusten pohjalta on pystytty selvittämään, että noin 40 prosenttiin eturauhassyöpätapauksista liittyy jonkinasteisia perinnöllisiä riskitekijöitä.

Tällä hetkellä tiedetään, että maternaalisesti periytyvillä tekijöillä on vaikutusta eturauhassyövän syntyyn. Geneettisten kytkeäntälyysien perusteella näyttäisi, että noin 40 % suomalaisilla esiintyvistä eturauhassyövistä periytyy äidin kautta, minkä uskotaan suurelta osin johtuvan X-kromosomaalisesta periytymisestä (Xu ym., 1998). Tässä työssä tutkimuskohteena on mitokondriaalinen DNA (mtDNA), jonka avulla pyritään selvittämään voisiko maternaalinen periytyminen olla myös mitokondriaalista, ainakin osittain. Nyt jo tiedetään, että eturauhassyövälle on tunnusomaista apoptoosin välttäminen, minkä tiedetään olevan mitokondrion säätelämä toiminto, joten tämäkin tieto tukee mitokondriaalisen DNA:n osuutta eturauhassyövän synnyssä.

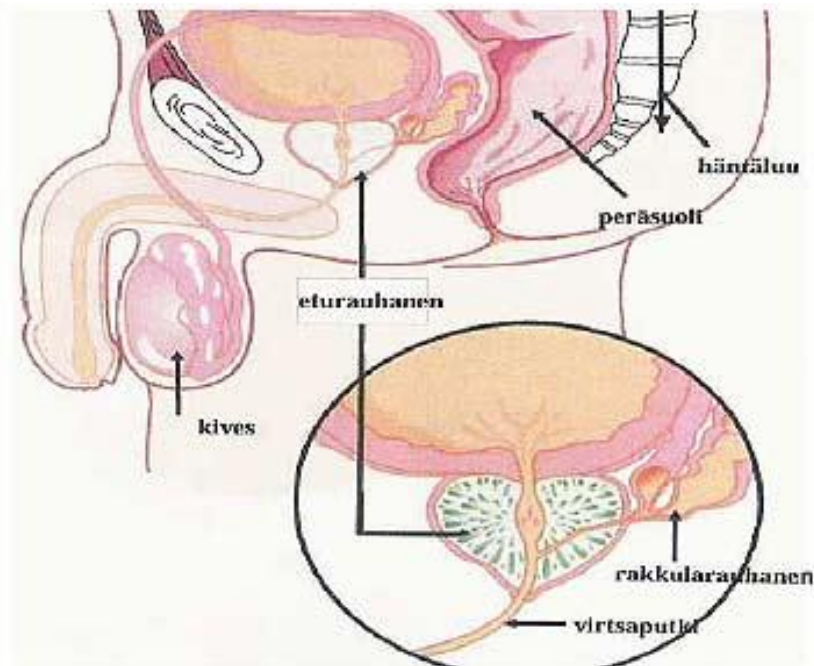
Usein mutaatiot mitokondriaalisessa DNA:ssa ovat neutraaleja. Siten väestöspesifiset polymorfiat, jotka ovat lähtöisin varhaisilta esi-isiltämme, on luokiteltu eri haploryhmiksi. Suurin osa haploryhmistä on usein keskittynyt tietyille maantieteellisille alueille kuten mantereille (Torroni ym., 1996). Tässä työssä tutkitaan mitokondriaalisten haploryhmien roolia alttiudessa sairastua sekä perinnölliseen että

sporadiseen eturauhassyöpään. Booker ym. julkaisivat vuonna 2006 tutkimuksen, joka oli tehty Yhdysvalloissa valkoihoisilla ja tuolla tutkimuksella he osoittivat haploryhmä U:n olevan riskitekijä eturauhassyövän synnyssä. Haploryhmä U:n ollessa Suomessa erityisen yleinen, tämä tutkielma tarjoaa oivan tilaisuuden jatkotutkimuksiin haploryhmä U:n mahdollisesta roolista eturauhassyöpäalitiuden aiheuttajana. Tässä työssä siis tutkitaan päteekö Bookerin ym. (2006) havaitsema tulos myös suomalaisessa väestössä, kun tiedetään suomalaisen väestön olevan geneettisesti hyvin homogeeninen kansa.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Eturauhanen

Eturauhanen (kuva 2.1) on miesten sukupuolirauhanen, joka on aikuisella miehellä noin luumun kokoinen, 20 grammaa painava elin. Eturauhanen muodostuu jo sikiöaikana, mutta varsinainen kehitys alkaa vasta murrosiässä miessukupuolihormonien vaikutuksesta. Eturauhasen tehtävänä on erittää osa siemennesteestä tarvittavasta nesteestä. Virtsaputken yläosaa ympäröivä eturauhanen on muodostunut noin viidestäkymmenestä pikkurauhasesta, jotka laskevat parinkymmenen tiehyen kautta virtsaputkeen. Rauhasen välissä on sileitä lihassyytä sekä runsaasti sidekudosta, jonka määrä vanhemmiten kasvaa. (Nienstedt ym., 1999, 438.) Eturauhasen hyvänlaatuinen liikakasvu onkin vanhemmilla miehillä syöpää yleisempi vaiva. Eturauhasen eritteessä on runsaasti hapanta fosfataasia, jota vapautuu verenkiertoon eturauhassyövässä. Veren happaman fosfataasin määrittämisellä on siten diagnostista merkitystä eturauhassyövässä (Nienstedt ym., 1999, 438).



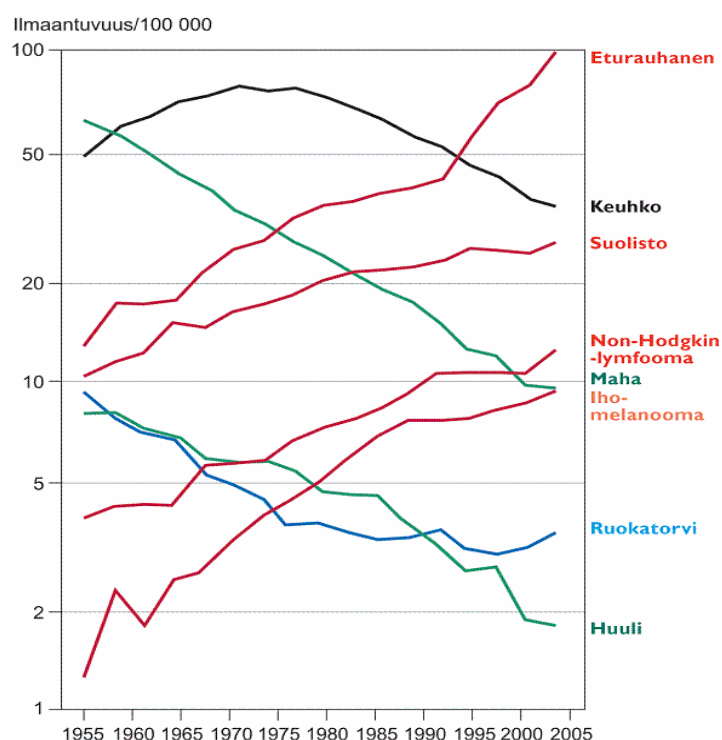
Kuva 2.1. Eturauhanen (<http://www.eturauhassyopa.info/rauhanen.htm>; 25.3.2008)

Eturauhasessa on kolme vyöhykettä: perifeerinen, välimuotoinen ja sentraalinen. Jokainen vyöhyke on erilailla taipuvainen joko syövän tai eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvun eli hyperplasian kehittymiselle. Vyöhykkeiden tarkka toiminta ei ole kuitenkaan selvillä. Tästä huolimatta vyöhykkeistä tiedetään perifeerisen olevan herkin eturauhassyövän suhteen, missä noin 70 % syöpätapauksista kehittyy, kun taas eturauhasen liikakasvua tapahtuu etupäässä välimuotoisessa vyöhykkeessä. Molekulaariset mekanismit näiden erilaisten alttiuksien takana eivät ole tunnettuja, mutta tärkeitä eroavaisuuksia vyöhykkeiden kesken on välittäjämetaboliassa olemassa. (Gómez-Zaera ym., 2006.)

2.2 Eturauhassyöpä

2.2.1 Eturauhassyövän esiintyvyys

Maailmanlaajuisesti eturauhassyöpä on yleisimmin miehillä diagnosoitu syöpä, jos ihosyöpäkasvaimia ei lasketa mukaan (Pakkanen ym., 2007). Puoli miljoonaa uutta eturauhassyöpätapausta diagnosoidaan maailmalla vuosittain. Euroopan unionin alueella eturauhassyöpä on toiseksi yleisin miesten syövästä, kun taas Yhdysvalloissa se on yleisin miesten syöpä (Gómez-Zaera ym., 2006). Myös Suomessa eturauhassyöpätapausten määrä näyttäisi kasvavan vuosi vuodelta (Kuva 2.2.1) ja vuodelle 2008 ennustettujen tapausten määräksi on arvioitu noin 5847 sairastunutta (Suomen syöpärekisteri, Finnish Cancer Registry, 2008). Teollistuneissa länsimaissa kuten Pohjoismaissa, Länsi-Euroopassa ja Yhdysvalloissa eturauhassyövän yleisyys on suurinta, kun taas Japanissa ja Kiinassa eturauhassyöpää esiintyy vähiten. Yhdysvalloissa on havaittu eturauhassyövän olevan mustaihoisilla valkoihoisia yleisempää. (Käypä hoito, 2007.) Tästä syystä afrikkalaistaustan katsotaan olevan tärkeä riskitekijä eturauhassyövän synnyssä (Lindström ym., 2006).



*Pukkala E, Sankila R, Rautalahti M.
Syöpä Suomessa 2006.*

Kuva 2.2.1. Ikävakioitu ilmaantuvuus miehillä 1953–2004 (yleisimmät syövät) (Lähde: Suomen syöpärekisteri, Finnish Cancer Registry, 2008)

2.2.2 Riskitekijät eturauhassyövässä

Korkean iän ja eturauhassyövän suhteen positiivisen perhetaustan tiedetään olevan tärkeitä riskitekijöitä eturauhassyöväälle, mutta tästä huolimatta taudin etiologiassa ollaan kaukana taudin syiden tunnistamisesta (Gómez-Zaera ym., 2006). Myös jo mainittu afrikkalaistausta on yksi eturauhassyövän tärkeistä riskitekijöistä (Lindström ym., 2006). Positiivinen perhehistoria on kuitenkin yksi vahvimmista eturauhassyöväälle altistavista tekijöistä. Suunnilleen 10–15 prosentilla eturauhassyöpää sairastavista miehistä on vähintään yksi sukulainen, joka on myös taudin kantaja. Potilas vs. kontrolli-tutkimusmallien on havaittu olevan tehokas metodi eturauhassyövän riskitekijöiden kartoittamiseen. (Schaid, 2004.) Monia tuman geenejä onkin pystytty liittämään eturauhassyövän syntyyn ja kehitykseen (Gómez-Zaera ym., 2006). Todennäköisiä kandidaattigeenejä eturauhassyövän suhteen ovat testosteronin ja muiden androgeenien metaboliioihin liittyvät geenit, koska eturauhassolujen kasvu on androgeeneistä eli

mieshormoneista riippuvaista. Geneettisten tekijöiden lisäksi mm. ympäristötekijät kuten ruokavalio ja elämäntyyli sekä sukupuolihormonit ovat mahdollisia riskitekijöitä eturauhassyövän kehittymisen kannalta (Dakubo ym., 2006). Runsas rasvojen käyttö ja lihavuus, joiden mekanismina mahdollisesti suurentunut mieshormonipitoisuus, suurentavat riskiä sairastua eturauhassyöpään (Lukkarinen ym., 1999). Erityisesti punaisen lihan syönti on yhdistetty eturauhassyöpään altistavana tekijänä. Myös tupakoitsijoilla on suurentunut riski ei-tupakoiviin nähden kuolla eturauhassyöpään (Lukkarinen ym., 1999). Useat tutkimukset suosivat hedelmien ja vihannesten suojaavaa vaikutusta eturauhassyöväälle. Myös tietyillä vitamiineilla kuten E:llä ja D:llä sekä seleenillä saattaa olla suojaava vaikutus eturauhassyöpää vastaan, tosin D-vitamiinin kohdalla on raportoitu myös päinvastaisista vaikutuksista (Schaid, 2004).

2.2.3 Perinnöllinen eturauhassyöpä

Suunnilleen 43 % miehistä, joilla diagnosoidaan eturauhassyöpä alle 55 vuoden iässä, sairastavat perinnöllistä eturauhassyöpää. Tiedetään, että näillä miehillä on suurentunut riski eturauhassyövän kehittymiselle tavanomaista nuoremmalla iällä, mutta silti taudin biologinen käyttäytyminen on edelleen epäselvää (Potter & Partin, 2000). On pystytty osoittamaan, että eturauhassyövän esiintyminen vähintään kolmella suvun jäsenellä näyttäisi johtuvan periytyvästä geenistä, jonka mutaatio johtaa pahanlaatuiseen muutokseen (Carter ym., 1992). Suuressa skandinaavisessa kaksostutkimuksessa Lichtenstein ym. (2000) esittävät, että geneettisillä tekijöillä olisi vaikutusta eturauhassyövän riskiin 42 prosenttia. Perinnöllisten riskitekijöiden uskotaan periytyvän autosomaalisesti dominantisti, autosomaalisesti resessiivisesti tai X-kromosomaalisesti (Matikainen ym., 2001). On myös tutkittu, etteivät perinnölliset tai sporadiset eturauhassyöpämuodot eroa toisistaan kliinisten tai patologisten ominaisuuksien osalta (Schaid, 2004).

2.2.3.1 Perinnölliselle eturauhassyöväälle altistavat geenit

Ensimmäinen perinnölliselle eturauhassyöväälle altistava geeni *HPC1* paikannettiin Yhdysvalloissa ja Ruotsissa tehtyjen tutkimusten perusteella kromosomin 1 pitkään

käsivarteen alueelle 1q24-25 (Grönberg ym., 1997). Suomalaisista perinnöllisistä eturauhassyöpätapauksista *HPC1* selittää kuitenkin vain alle 15 % tapauksista (Lukkarinen ym., 1999). Xu ym. (1998) raportoivat hieman myöhemmin, että noin 40 % perinnöllisistä eturauhassyöpätapauksista periytyy X-kromosomin välityksellä eli maternaalisesti. Viime vuosien aikana tehdyillä kytkentäanalyyseillä on pystytty identifioimaan ainakin kuusi riskilokusta perinnölliselle eturauhassyövälle, joita ovat siis jo mainitut *HPC1/RNASEL* (1q24-25), *HPCX* (Xq27-28) sekä näiden lisäksi *HPC2/ELAC2* (17p11), *PCAP* (1q42.2-43), *HPC20* (20q13) ja *CAPB* (1p36, 8p22-23) (Schaid, 2004). Tutkimuksilla on pystytty osoittamaan, että tietyt muutokset *ELAC2* - geenissä saattavat vaikuttaa eturauhassyöpään väestötasolla (Rökman ym., 2001). On kuitenkin selvää, että jos *HPC2/ELAC2*:lla on rooli eturauhassyövässä, se on heikko useimmissa eturauhassyövän muodoissa. *CAPB* on yhdistetty erityisesti perheisiin, joilla on voimakas nuorella iällä diagnosoitu eturauhassyöpähistoria. *CAPB*:ia on myös tutkittu mahdollisena yhteisenä riskitekijänä perheissä, joilla esiintyy sekä eturauhassyöpä että aivosyöpä. (Schaid, 2004.) Mutaatiot geenissä *HPCX* voidaan mahdollisesti yhdistää myös sporadisiin eturauhassyöpätapauksiin (Rökman, 2004).

Ituradan mutaatioita geneissä *BRC1* ja *BRC2*, joiden tiedetään lisäävän rintasyövän riskiä, on myös tutkittu eturauhassyövän yhteydessä. Miehillä, jotka kantavat mutaatiota joko geenissä *BRC1* (17q21) tai *BRC2* (13q12), on merkittävästi kohonnut riski sairastua eturauhassyöpään, mutta nämä mutaatiot ovat harvinaisia ja selittävät siten ainoastaan pienen osan perinnöllisistä eturauhassyöpätapauksista. Lisätutkimuksia kaipaavalla *MSRI*-geenillä (8p22-23), joka koodaa infektioissa vasteina toimivia proteiineja, saattaa myöskin olla altistava vaikutus eturauhassyövälle. (Schaid, 2004.) Suomalaisilla perinnöllistä eturauhassyöpää kantavilla perheillä tehdyn tutkimuksen mukaan on löydetty myös alue 3p26, joka todennäköisesti sisältää altistavan geenin eturauhassyövälle (Rökman ym., 2005). Kaikkien edellä mainittujen löydösten valossa on selvää, että perinnöllinen eturauhassyöpä on heterogeeninen tauti, jolloin alttiuteen sairastua tarvitaan monien eri geenien yhteisvaikutus (Grönberg ym., 2000). Tulevaisuudessa tarvitaan tutkimuksia myös tavallisten geneettisten polymorfoidien roolista, koska niillä uskotaan olevan merkitystä eturauhassyövän synnylle (Schaid, 2004).

2.2.3.2 Perinnöllisen eturauhassyövän yhteys muihin syöpiin

Tutkimuksissaan Grönberg ym. (2000) tutkivat perinnöllisen eturauhassyövän ja muiden pahanlaatuisten kasvainten yhteyttä. Suurimmalle osalle perinnöllistä eturauhassyöpää sairastavista perheistä ei löydetty yhteyttä muihin pahanlaatuisiin kasvaimiin. Kuitenkin osalle perinnöllistä eturauhassyöpää kantavista perheistä löydettiin yhteys rintasyövän ja/tai mahasyövän välille. Yhteys näiden syöpien välillä saattaa johtua tavallisesta ituradan mutaatiosta syöväälle altistavassa geenissä. Kuitenkin lisää tutkimuksia tarvitaan asian varmistamiseksi (Grönberg ym., 2000). Useilla muillakin tutkimuksilla on haluttu tutkia eturauhas- ja rintasyöpien välistä yhteyttä, koska ne ovat yleisimmin diagnosoituja syöpiä miesten ja naisten kesken. Tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet eturauhassyövän ja rintasyövän välisen yhteyden olevan heikko ja sen uskotaan johtuvan todennäköisesti moninaisista geneettisistä sekä ympäristöllisistä tekijöistä (Schaid, 2004). Baker ym. (2005) käyttivät myöhemmin tutkimuksissaan kaksosrekisteriin Ruotsissa, Tanskassa ja Suomessa jo valmiiksi kerättyä dataa ja tutkivat eturauhas-, rinta- ja kolorektaalisyöpien genetiikkaa. Tutkimustulosten perusteella näiden syöpien välillä geneettinen alttius on pientä tai kohtuullista (Baker ym., 2005). Erot voivat johtua populaatioista, eli näissäkin on todennäköisesti väestökohtaisia eroja. Myös suomalaisnäytteillä on tehty vastaavanlainen tutkimus (Matikainen ym., 2001), joka osoitti yhteyden mahasyövän ja varhaisessa vaiheessa puhkeavan eturauhassyövän välille. Mahasyövän ja eturauhassyövän välinen yhteys saattaa olla seurausta jaetuista geneettisistä tai ympäristöllisistä riskitekijöistä, mutta havaittu yhteys voi olla myös sattumaa. Samassa tutkimuksessa suomalaisella väestöllä osoitettiin, että merkittäviä perinnöllisiä tekijöitä voidaan yhdistää sekä vanhemmilla että nuoremmilla miehillä puhkeavaan eturauhassyöpään. (Matikainen ym., 2001.)

2.3 Mitokondrio

Mitokondriot ovat kahden kalvon rajaamia soluorganelleja solun sytoplasmassa. Mitokondriot ovat suunnilleen bakteerin kokoisia, niiden halkaisijan ollessa tyypillisesti noin 1 µm. Mitokondriota ympäröivä ulkokalvo on sileä, kun taas sisäkalvo on runsaasti

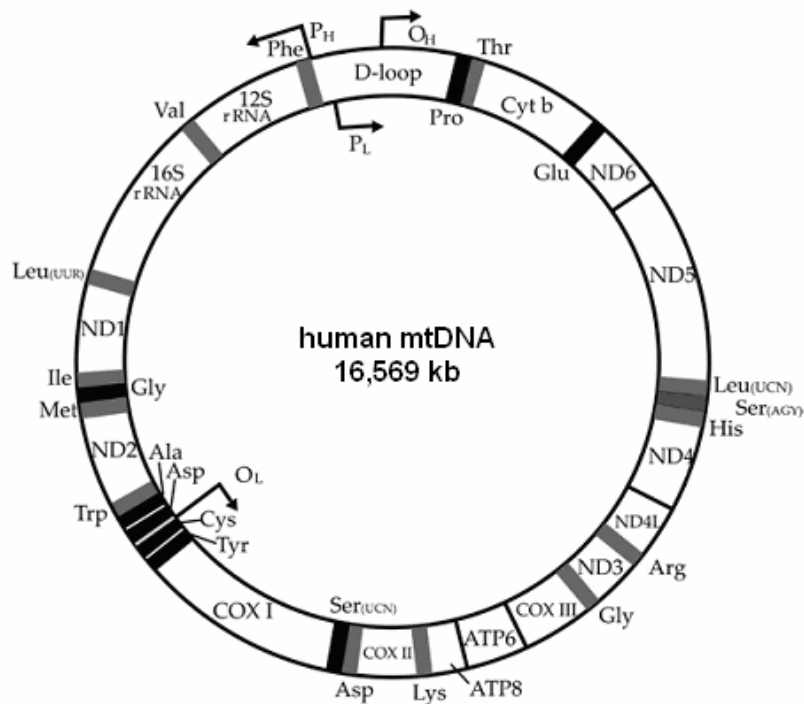
poimuttunut. Sisäkalvo muodostaa mitokondrion sisään lukuisan määrän poimuja, joita kutsutaan kristoiksi. Sisäkalvon ympäröimää tilaa kutsutaan matriksiksi. Ulkokalvo on hyvin läpäisevä ja se on pääasiassa muodostunut vastakkain asettuneista fosfolipideistä, joihin on kiinnittyneenä useita porineiksi kutsuttuja proteiineja, jotka päästävät lävitseen kaikki alle 5 kilodaltonin kokoiset molekyylit. Sisäkalvon rakenne läpäisee huonosti molekyylejä ja sen koostumuksesta 80 % on proteiineja ja loput 20 % on lipidejä. Sisäkalvon proteiinit osallistuvat hapetusreaktioihin, ATP:n muodostukseen (ATP-syntaasi) ja aineiden kuljetukseen sisäkalvon läpi.

Mitokondrioita on kaikissa muissa solutyypeissä paitsi kypsissä erytrosyyteissä eli punasoluissa (Nienstedt ym., 1999, 36). Mitokondrioiden koko, muoto ja paikka vaihtelevat sen mukaan mistä solutyypistä ja kudostoiminnosta on kulloinkin kyse. Ihmisen solut käsittävät useista sadoista tuhansiin mitokondriota riippuen solun metaboliasta ja energiatarpeesta. Mitokondriot lisääntyvät ainoastaan jakautumalla jo olemassa olevista mitokondrioista, tällöin jokainen mitokondrio sisältää oman DNA:n, RNA:n ja ribosomit. (Nelson & Cox, 2000.) Mitokondrion oman DNA:n ja proteiinisynteesin vuoksi sen voidaan olettaa olleen alun perin itsenäinen solu. Eukaryoottisten mitokondrioiden ajatellaan polveutuneen endosymbioosin välityksellä aerobisista bakteereista ja kloroplastien syanobakteereista (Alberts ym., 2002).

Mitokondriota voidaan sanoa solun energiayksiköksi. Mitokondriolla on tärkeä rooli energiametaboliassa, apoptoosissa sekä solulle haitallisen aktiivisen hapen (reactive oxygen species, ROS) tuottamisessa. Parhaiten tunnettu mitokondriaalinen toiminto on adenosiinitrifosfaatin eli ATP:n tuottaminen soluhengityksen, toiselta nimeltään oksidatiivisen fosforylaation, kautta, jossa ravintoaineisiin sitoutunut kemiallinen energia muunnetaan ATP:ksi. Oksidatiiviseen fosforylaatioon osallistuvat proteiiniryhmittymät on koodattu sekä tuman että mitokondrion geneistä. (Gallardo ym., 2006.)

2.3.1 Mitokondriaalinen DNA

Ihmisen mtDNA on kaksijuosteinen, 16569 emäsparista muodostuva rengasmainen DNA-molekyyli (kuva 2.3.1). Jokaisessa mitokondriossa on 1-11 kopiota mitokondriaalista DNA:ta. Mitokondriaalinen DNA sijaitsee mitokondrion sisällä, matriksissa. Yhdeltä kannalta katsottuna Ihmisen Genomi Projekti (Human Genome Project) alkoi juuri ihmisen mitokondriaalisen DNA:n täydellisen sekvenssin julkaisemisella vuonna 1981, jota alettiin kutsua Cambridgen viitesekvenssiksi (The human mtDNA Cambridge Reference Sequence (CRS)) (Andrews ym., 1999).



Kuva 2.3.1 Ihmisen mitokondriaalinen DNA

(<http://herkules oulu.fi/isbn9514268490/html/c347.html>; 22.2.2008)

Mitokondriaalisen DNA:n on osoitettu periytyvän ainoastaan äidiltä ja siten se ei läpikäy rekombinaatiota (Giles ym., 1980). Tyypillisesti nisäkässolut sisältävät, riippuen solutyypistä, 10^3 – 10^4 kopiota mtDNA:ta, ja se voi kahdentua itsenäisesti tuman DNA:sta (Lightowers ym., 1997). Solun jakautumisessa mitokondrio ja sen genomi

jakautuvat sattumanvaraisesti tytärsoluille ja näin ollen syntyneitä tilaa kutsutaan heteroplasmiseksi. Heteroplasmian ja jopa homoplasmian tasot voivat nousta eri solulinjoissa (Fernández-Silva ym., 2003).

Ihmisen mitokondriaalinen DNA eroaa tuman DNA:sta monella tapaa, muun muassa siten, ettei se sisällä lainkaan histoneita, jotka sitoutuisivat DNA:han ja stabiloisivat DNA:n rakennetta. Erilaista tuman DNA:han verrattuna on mitokondriaalisen DNA:n tiukka pakkautumisaste, sillä lähes jokainen nukleotidi koodaa joko proteiinia, siirtäjä-RNA:ta (tRNA) tai ribosomeja. Vaikka geenit ovat mitokondriaalisessa DNA:ssa tiukasti pakattuja, kaikkia ei silti transkriptoida samassa suunnassa. Erityistä on myös, että geenien säätelyalueita on mtDNA:ssa erittäin vähän. Tämän lisäksi mitokondrion omat ribosomit eroavat eukaryoottisolun muista ribosomeista. Mitokondriaalinen proteiinisynteesi käyttää ainoastaan 22 tRNA:ta, kun taas sytosolissa tapahtuvaan proteiinisynteesiin tRNA:ita vaaditaan 30 tai enemmän. Normaali kodoni-antikodoni pariutuminen on mitokondriossa vapautuneempaa, mikä tarkoittaa, että useat mitokondrion siirtäjä-RNA:t hyväksyvät minkä tahansa emäksen kolmanneksi kodoniksi, jolloin yksi tRNA voi käyttää neljää eri kodonia tuodessaan aminohappoa ribosomille. Myös mitokondrioiden geneettinen koodi eroaa tuman universaalista koodista siten, että neljä kodonia 64:stä koodaa eri aminohappoa kuin eukaryoottien sytosolissa (taulukko 2.3.1). (Alberts ym., 2002.)

Taulukko 2.3.1. Erot universaalisten ja mitokondriaalisten (nisäkkäillä) geneettisten koodien välillä. (Mukaillen Alberts ym., 2002, 814.)

kodoni	universaali koodi	mitokondriaalinen koodi
UGA	STOP	Trp
AUA	Ile	Met
CUA	Leu	Leu
AGA	Arg	STOP
AGG	Arg	STOP

MtDNA sisältää yhteensä 37 eri geeniä ja ne eivät sisällä lainkaan introneita toisin kuin tuman koodaamat geenit. Kaikki 37 mtDNA:n koodaamaa geeniä liittyvät jollakin tavalla energian tuotantoon tai energian varastointiin ATP-muodossa. MtDNA:n geneeistä kaksi koodaa ribosomaalista RNA:ta (rRNA), joista toinen on pieni (12S) ja

toinen on suuri (16S). 22 mtDNA:n geeniä koodaa siirtäjä-RNA:ta (tRNA). Sekä rRNA:ta että tRNA:ta tarvitaan mitokondriaalisten proteiinien synteesiin (Gallardo ym., 2006). Loput 13 geeniä koodaavat alayksikköjä hengitysketjun eli oksidatiivisen fosforylaation proteiineihin, joita on kaikkiaan 87 (Nelson & Cox, 2000). Nämä 13 mtDNA:n koodaamaa hengitysketjun alayksikköä ovat: MTND1, MTND2, MTND3, MTND4, MTND4L, MTND5, MTND6, MTATP6, MTATP8, MTCO1, MTCO2, MTCO3 ja MTCYB (Moilanen & Majamaa, 2003), joista seitsemän ensimmäistä koodaavat NADH-dehydrogenaasin alayksiköitä, kaksi seuraavaa ATP-syntaasin alayksiköitä ja neljä viimeistä koodaavat sytokromi c-oksidaasin alayksiköitä. MtDNA:n koodaamien alayksikköentsyymien järjestäytymisen mitokondriaalisessa genomissa voi nähdä kuvasta 2.3.1. On kuitenkin syytä muistaa, että suurin osa mitokondrioiden proteiineista syntyy tuman DNA:n koodaamana, syntetisoituu sytoplasman ribosomeilla ja kulkeutuu sieltä mitokondrioihin (Heino & Vuento, 2002, 78).

Mitokondriaalinen DNA on erittäin altis vaurioitumiselle, minkä johdosta mtDNA:n mutaationopeus on 10–20 kertaa nopeampaa kuin tuman vastaava. Korkea mutaationopeus on seurausta DNA:n korjausmekanismien rajoittuneisuudesta, suojaavien, DNA:ta sitovien proteiinien kuten histonien puuttumisesta sekä vapaiden happiradikaalien tuoton läheisestä sijainnista. (McKenzie ym., 2004.) Mitokondriaalinen DNA läpikäy enemmän transitiopistemutaatioita, jossa toinen puriini- ($A \leftrightarrow G$) tai pyrimidiiniemäs ($T \leftrightarrow C$) korvaa toisen, kuin transversiopistemutaatioita, jossa puriiniemäs korvaa pyrimidiiniemäksen tai päinvastoin (Galtier ym., 2006). Koska satoja mitokondrioita ja tuhansia kopioita mtDNA:sta on kaikissa soluissa kypsiä punasoluja lukuun ottamatta, haitallisia mtDNA-mutaatioita voi esiintyä kaikissa, sekä somaattisen että ituradan ihmisoluissa ja -kudoksissa (Wallace, 1994).

MtDNA:n kaksi komplementaarista säiettä on emäskoostumuksiltaan epäsymmetrisiä: toinen säikeistä on G-rikas, josta käytetään nimitystä raskas (heavy) säie tai H-säie, kun taas toinen säikeistä on C-rikas, jolloin siitä käytetään nimitystä kevyt (light) säie tai L-säie. MtDNA:n koodaamista 37 geenistä 28 on koodattu H-säikeen mukaan ja loput 9

geeniä koodautuu siis L-säikeen emäksistä. Koska mitokondriaaliset geenit ovat järjestäytyneet yhtäjaksoisesti mtDNA:n genomiin, on siinä ainoastaan vähän alueita, jotka eivät koodaa mitään geeniä. Ei-koodaavasta alueesta käytetään kahta eri termiä, joita ovat kontrollialue (control region) ja D-loop-alue (non-coding displacement loop). Kaikkiaan ei-koodaava-alue on noin 1200 nukleotidia pitkä eli se muodostaa alle 7 % mitokondriaalisesta genomista ja se sijaitsee ns. nukleotidi (nt) ”0”-kohdan molemmilla puolilla. Kontrollialue-nimitys tulee siitä, että alue toimii mtDNA:n pääasiallisena säätelyalueena sekä se sisältää signaalit, jotka säätelevät RNA- ja DNA-synteesiä. D-loop-alueella (nt 16104–191, www.mitomap.org, 2008) muodostuu kolminkertaista DNA-säierakennetta, joka sisältää replikaation aloituskohdan H-säikeelle (O_H) sekä promoottorit H- ja L-säikeiden transkriptioille (P_H ja P_L) (kuvassa 2.3.1) (Navaglia ym., 2006). L-säikeen replikaation aloituskohta (O_L) on erotettu H-säikeen aloituskohdasta (O_H) $2/3$:lla mtDNA:n pituudesta (kuvassa 2.3.1) (Wallace, 1994). O_L sijaitsee mtDNA:n toisella ei-koodaavalla alueella, joka on ainoastaan n. 30 nukleotidia pitkä sijaiten tRNA-klusterin sisällä (Fernández-Silva ym., 2003).

MtDNA:n korkean mutaationopeuden lisäksi tietyillä alueilla mitokondriaalista genomia mutaationopeus on nopeampaa kuin toisilla. Ei-koodaavan-alueen erittäin paljon vaihtelevilla sekvensseillä mutaationopeus on huomattavasti nopeampaa kuin koodaavilla alueilla (Chinnery ym., 1999). Howellin ym. (1996) tekemässä tutkimuksessa he osoittivat, että mitokondrion ei-koodaavalla alueella (D-loopilla) mutaationopeus olisi korkeinta koskaan raportoitua. Ei-koodaava-alue sisältää myös kaksi hypervaihtelevaa aluetta HVS-I ja HVS-II. Näillä alueilla on erittäin korkea haplotyyppien vaihtelevuus. Todennäköisyys, että kahdella sattumanvaraisesti valitulla yksilöllä olisi identtiset mtDNA:n haplotyyppit HVS-I ja HVS-II -alueilla on alle 5 % (Schwartz & Vissing, 2004).

2.3.2 Mitokondriaalisen DNA:n periytyminen

Mitokondriaalisen DNA:n tiedetään periytyvän ainoastaan äidin kautta (Giles ym., 1980). Munasolu sisältää noin 100 000 mitokondriota ja mtDNA:ta, kun sitä vastoin siittiösolussa niitä on vain noin sata. Tämä osaltaan johtaa siihen, ettei siittiösoluilla ole

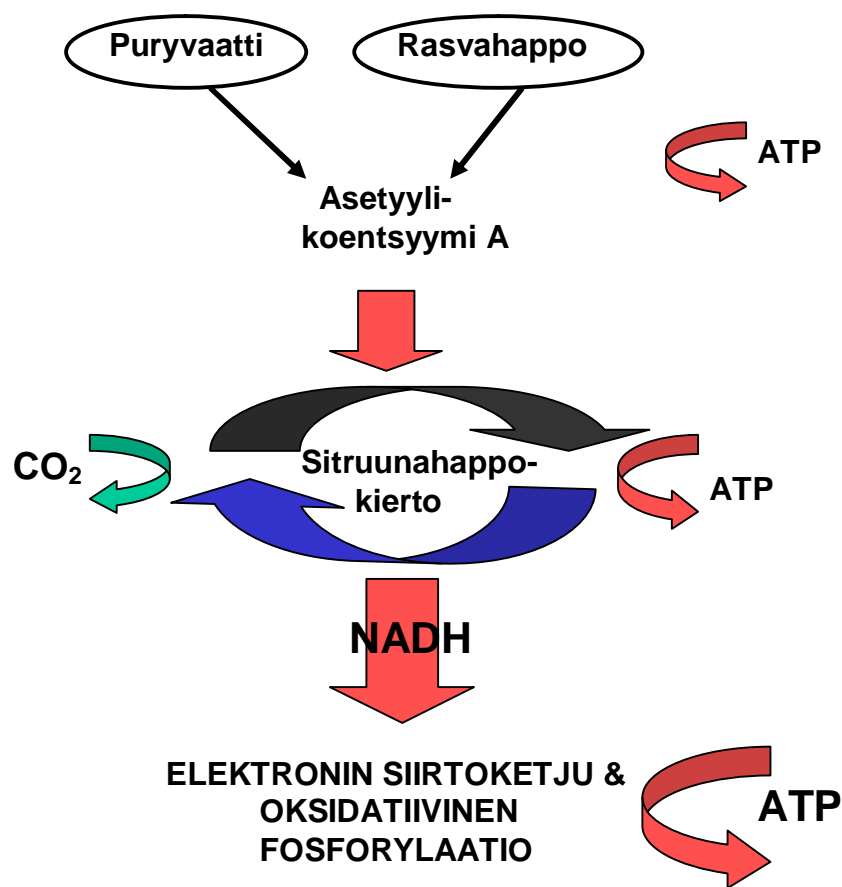
geneettistä vaikutusta perittyyn mtDNA:han (Wallace ym., 1999). Koska isän perimä ei vaikuta mitokondriaaliseen DNA:han eikä sen mutaatioihin, ovat tutkijat voineet mtDNA:n avulla selvittää mahdollisen kanta-äitimme alkuperää. On oletettavaa, että äitilinjan kantaäitinä on ollut Afrikassa noin 150 000 vuotta sitten elänyt nainen (Wallace ym., 1999), jota kutsutaan Mitokondrio-Eevaksi ("Mitochondrial Eve") (kuvassa 2.5.b merkitty "mtEve"). Periytyvyytensä tähden mitokondriaalinen DNA on osaltaan mahdollistanut maternaalisesti periytyvien sairauksien tutkimisen ja sinällään avannut uuden kentän genetiikan tutkimuksessa.

2.3.3 Energiantuotanto mitokondrioissa

Mitokondrioita voidaan pitää solun energialaitoksina, joissa ravintoaineisiin kemiallisesti sidottu energia muutetaan oksidatiivisen fosforylaation kautta ATP:ksi. Mitokondrioissa energia varastoidaan korkeaenergiisiin kemiallisiin sidoksiin, yleensä ATP:hen, joka on solun pääasiallinen energianlähde. Mitokondrion oksidatiivinen fosforylaatio tarjoaa kolme elintärkeää ja toisiinsa yhdistyvää toimintoa: NADH:n ja FADH₂:n uudelleenhapettuminen, energian tuottaminen ATP:n muodossa sekä ruumiin lämpötilan säätely lämpöä tuottamalla (Wallace, 1994).

Hiilihydraatit ja rasvoista saatavat rasvahapot toimivat ensisijaisesti solujen energialähteinä. Energiantuotanto hiilihydraateista ja rasvahapoista tapahtuu osittain eri menetelmillä, mutta on näillä yhteisiäkin tekijöitä, varsinkin reaktiosarjan loppupäässä. Hiilihydraatit eli polysakkaridit pilkkoutuvat monosakkarideiksi, jotka muunnetaan glykolyysiin sopiviksi glukoosijohdannaisiksi. Glykolyysissa glukoosi pilkotaan puryvaatiksi. Rasvoja hajottamalla syntyy rasvahappoja. (Heino & Vuento, 2002, 80–97.) Puryvaatin ja rasvahappojen muodostus ravintoaineista tapahtuu solulimassa, josta ne siirtyvät mitokondrioon. Sitruunahappokierrossa puryvaatti muutetaan hiilidioksiksi ja vedeksi. Ennen puryvaatin varsinaista siirtymistä sitruunahappokiertoon, se muutetaan asetyylikoentsyymi-A:ksi mitokondrion matriksissa. Sitruunahappokierron reaktioissa syntyy NADH:ia ja vähän ATP:tä.

Mitokondrion matriksissa tapahtuu puryvaatin (palorypälehdhappo) ja rasvahappojen hapetus (β -oksidatiio), joita seuraa sitruunahappokierto. Mitokondrion sisäkalvolla tapahtuu oksidatiivinen fosforylaatio, jossa muutetaan sitruunahappokierrossa syntyneen NADH:n energia ATP:n muotoon. Toisin sanoen oksidatiivisessa fosforylaatiossa siirretään elektronit orgaaniselta yhdisteeltä happimolekyyleille. Mitokondrioissa tapahtuvasta energiantuotannosta on esitetty yksinkertaistettu kaavio kuvassa 2.3.3.



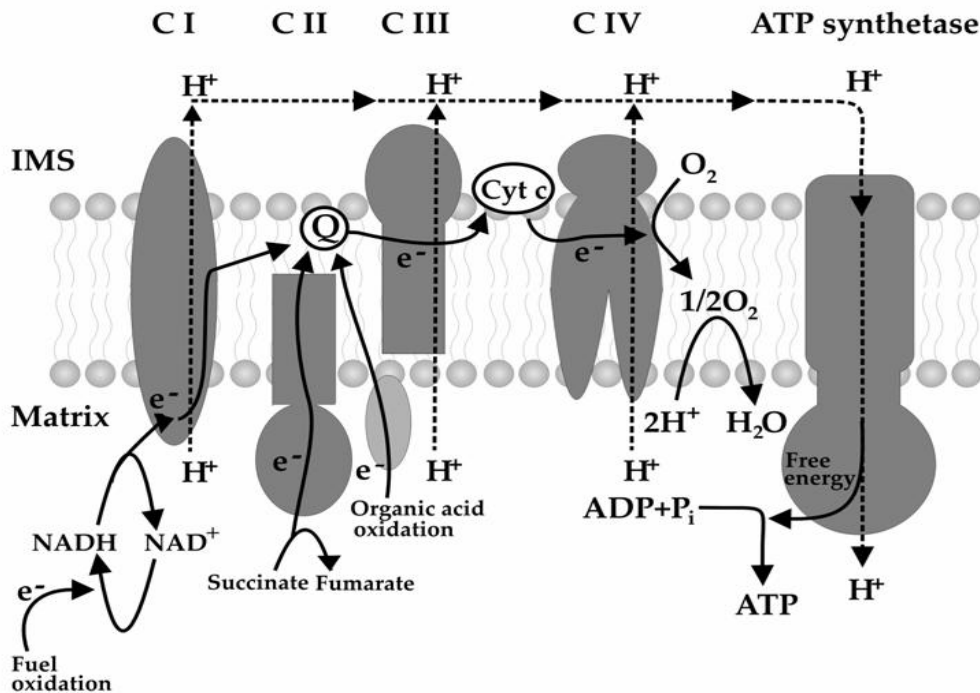
Kuva 2.3.3. Yksinkertaistettu kaavio energiantuotosta mitokondrioissa.

2.3.3.1 Oksidatiivinen fosforylaatio

Itse asiassa oksidatiivisella fosforylaatiolla tarkoitetaan aineenvaihduntareittiä, joka koostuu elektroninsiirtoketjusta sekä ATP-synteesistä. Oksidatiivinen fosforylaatio-

koneisto käsittää viisi alayksikkö-entsyymi-kompleksia, jotka ovat järjestäytyneet mitokondrion sisäkalvon sisäpuolelle. Kompleksi I (NADH-dehydrogenaasi) siirtää elektronit NADH:lta, sillä välin kun kompleksi II (sukkinaattidehydrogenaasi) kerää elektronit sukkiinaatilta. Molemmat entsyymit sitten kuljettavat saamansa elektronit koentsyymi Q:lle. Pelkistynyt koentsyymi Q liikkuu mitokondrion sisäkalvossa, kunnes löytää kompleksin III pelkistäen sen. Elektronit virtaavat kompleksin III läpi sytokromi c:lle, joka liikkuu mitokondrion sisä- ja ulkokalvon välisessä tilassa ja telakoituu lopulta kompleksiin IV (sytokromioksideasi) pelkistäen sen. Kompleksi IV katalysoi elektroninsiirron viimeistä vaihetta eli hapen pelkistämistä vedeksi. Energia, joka vapautuu elektroninsiirtoketjussa, käytetään protonien pumppaamiseen ulos, läpi mitokondriaalisen sisäkalvon. Koska vetyioni on sähköisesti varattu, samalla syntyy kalvopotentiaali sisäkalvon yli. Vetyionien pitoisuusero eli elektrokemiallinen gradientti ja kalvopotentiaali edustavat energiaa. Kalvopotentiaalin vaikutuksesta vetyionit pyrkivät siirtymään takaisin matriksiin. Protonit pääsevätkin takaisin matriksiin sisäkalvolla sijaitsevan ATP-syntaasin (kompleksi V) kautta ja tällä energialla ATP-syntaasi pystyy fosforyloimaan ADP:n (adenosiinidifosfaatti) ATP:ksi. Tämä protonimotorinen voima kytkee toisiinsa siis hapen hapetuksen ja ADP:n fosforylaation. (Heino & Vuento, 2002, 80–97; Wallace, 1994.) Kuvasta 2.3.3.1 nähdään elektroninsiirtoketjussa toimivat kompleksit I-IV sekä ATP-syntaasi.

Protoninsiirtäjinä eli ns. protonipumppuina toimivat elektroninsiirtoketjun entsyymeistä kompleksit I, III ja IV (kuva 2.3.3.1). Sillä, mihin kohtaan ketjua elektronit syötetään, on merkitystä energiantuoton kannalta. Jos NADH on luovuttaja, joka luovuttaa elektronit kompleksille I, elektronit kulkevat kaikkien kolmen protonipumpun kautta ja saavat aikaan maksimaalisen vetyionien siirron matriksista ulos ja tämän seurauksena maksimaalisen ATP-tuoton. Jos sitä vastoin luovuttaja on sukkiinaatti (sukkinaattidehydrogenaasin $FADH_2$), ETPP tai glyseroli-3-fosfaattihydrogenaasi, elektronit kulkevat kompleksien III ja IV läpi, mutta eivät kompleksin I läpi, joten tällöin siirrettyjen protonien määrä on pienempi ja samoin tuotetun ATP:n määrä. (Heino & Vuento, 2002, 80–97.)



Kuva 2.3.3.1 Elektroninsiirtoketjun kompleksit I-IV(C I-C IV) ja ATP-syntaasi (kompleksi V), IMS=kalvojen välinen tila, matrix=mitokondrion matriksi (<http://herkules.oulu.fi/isbn9514268490/html/c347.html>; 26.2.2008)

2.4 Häiriöt mitokondriaalisessa DNA:ssa

Mitokondrioita voidaan sanoa semiautonomisiksi soluelimiksi, jotka toimittavat tärkeitä toimintoja solujen metaboliassa ja solukuoleman eli apoptoosin säätelyssä. Apoptoosilla tarkoitetaan solujen jakautumista säätelevien geenien ohjaamaa solun ohjelmoitua kuolemista. Apoptoosi on osa yksilönkehitystä ja normaalia kudosten uudistumista. Tärkein mitokondrion välittämistä toiminnoista on kuitenkin ravintoaineisiin sidotun kemiallisen energian muuntaminen ATP:ksi oksidatiivisen fosforylaation kautta. Oleelliset osat oksidatiivisesta fosforylaatiokoneistosta koodaa mtDNA, siten haitalliset virheet mtDNA:ssa voivat johtaa ja olla syy-yhteys erilaisiin sairauksiin (Hofmann ym., 1997). Harvinaiset mutaatiot sekä tuman että mitokondrion koodaamissa oksidatiivisen fosforylaatio-koneiston geneissä johtavat tautioireyhtymiin, joissa on mukana neurologisia, muskulaarisia tai metabolisia ilmentymiä (Saxena ym., 2006).

Oksidatiivisen fosforylaation suorituskyvyn on osoitettu heikkenevän iän myötä erinäisissä mitoosinjälkeisissä kudoksissa. Oksidatiivisen fosforylaation heikkenemisen katsotaan olevan yhtäaikaista ikään liittyvien somaattisten mtDNA:n mutaatioiden sekä piste- että häviämämutaatioiden kasautumisen kanssa (Wallace, 1994). Somaattisten mutaatioiden kasautuminen heikentää solun toimintoja johtaen lopulta mitokondriaalisen läpäisevän siirtymähuokosen aktivointiin ja solun kuolemaan apoptoosin kautta (Brandon ym., 2006).

Mutaatiot mtDNA:ssa voivat olla joko haitallisia (patogeenisiä), neutraaleja tai suotuisia (sopeutuvia). Virheet mitokondriaalisissa toiminnoissa voivat johtaa vakaviin seuraamuksiin eri organismeissa. Yli 75 ihmissairautta on yhdistetty mitokondriaalisiin toimintahäiriöihin ja monet näistä taudeista ovat tautia aiheuttavien mutaatioiden aikaan saannoksia mitokondriaalisessa genomissa (Herrnstadt & Howell, 2004). Kaikki nämä taudit ovat poikkeuksetta äidiltä perittyjä. Yleisesti mitokondriaalisen DNA:n mutaatiot aiheuttavat keskushermoston, aistinelimien ja lihaksiston sairauksia. Toisaalta on olemassa todisteita siitä, että tietyt yhdistelmät muutoin harmittomina tunnetuista polymorfioista mitokondriaalisissa sukujuurissa saattavat olla alttiutena moninaisille sairauksille (Chinnery ym., 2000; Ruiz-Pezini ym., 2000; Wallace ym., 1999). Näistä yhdistelmäpolymorfioista syntyvät vaikutukset ovat todennäköisimmin syinä aminohappomuutoksille sekvenssin proteiineja koodaavissa geneissä (Moilanen & Majamaa, 2003). Näin ollen erilaiset virheet mitokondriaalisessa DNA:ssa ovat osallisina mitokondriaalisissa sairauksissa, joista on olemassa monenlaisia kliinisiä piirteitä/oireita.

On olemassa monia esimerkkitapauksia sairauksia aiheuttavista yhden nukleotidin mutaatioista mtDNA:ssa. Esimerkkinä perinnöllinen sairaus nimeltään *MERRF* (*myoclonic epilepsy and ragged red fiber disease*), joka johtuu mutaatiosta yhdessä mitokondriaalisen tRNA:n geenissä nukleotidissa 8344 A→G. Mutaation johdosta elektroninsiirtoketjussa ja ATP:n tuotannossa tarvittavien mitokondriaalisten proteiinien synteesi on heikentynyt. Mutaation aiheuttamana *MERRF*:iä sairastavat potilaat kärsivät lihasten heikkoudesta tai sydänongelmista ja epilepsiasta tai dementiaasta. Kun mitokondriot toimivat puutteellisesti/virheellisesti, lihas- ja hermokudokset kärsivät

eniten, koska erityisesti ne tarvitsevat suuria määriä ATP:tä toimiakseen optimaalisesti. Suurin osa *MERRF*-potilaista on liitetty 8344-muutokseen, mutta muitakin mutaatioita on havaittu, minkä takia myös *MERRF*:n kohdalla on kyse geneettisesti heterogeenisestä taudista (Alberts ym., 2004; Zeviani & Antozzi, 1997). Toinen paljon tutkittu, mitokondriaalisen DNA:n mutaatioiden välityksellä periytyvä tauti on *Leberin perinnöllinen näköhermorappeuma (LHON)*. *LHON* on vaikeaan, yleensä pysyvään näkövammaisuuteen johtava tauti, joka puhkeaa nuorella aikuisiällä. *LHON* on geneettisesti heterogeeninen tauti eli useat mtDNA-mutaatiot vaikuttavat sen puhkeamiseen (Nelson & Cox, 2000; www.mitomap.org, 2008). MtDNA:n mutaatiot eivät kuitenkaan täysin selitä taudin puhkeamista, sillä kaikki primäärimutaatioiden omaavat henkilöt eivät sairastu, joten taudin taustalla on myös todennäköisesti tuman geenejä. Wallace ym. (1999) ovat tutkimuksissaan havainneet, että tietyt maanosiin linkatut mtDNA:n sukujuuret, kuten haploryhmä J ovat alttiimpia ilmentämään *LHON*:n kliinisiä oireita kuin toiset.

Kuten jo tiedetään, ihmisen mitokondriaalisella DNA:lla on hyvin korkea mutaationopeus, joka on vähintään kymmenenkertainen tuman geenien vastaavaan. Täten ainoastaan pienellä osalla mtDNA:ssa tapahtuvista nukleotidimuutoksista on seurauksena sairauten johtava mutaatio (Finnilä ym., 1999). Yksi tärkeänä pidetty kriteeri patogeenisuudelle on heteroplasmia (Chinnery ym., 1999). Koska mutaatiot ovat umpimähkäisiä, mikä tahansa emäs, joko koodaava tai ei-koodaava, voi muuttua mtDNA:ssa. Täten erilaisten mtDNA:n mutaatioiden seuraamukset ja niiden jakautumiset solujen välillä voivat erota paljonkin toisistaan. D-loop-alueella tapahtuvat mutaatiot voivat aiheuttaa hyvinkin vakavia seuraamuksia mitokondriaalisiin toimintoihin, koska ne saattavat häiritä transkriptiota koko mtDNA:n genomissa (Navaglia ym., 2006). Somaattisissa kudoksissa ilmenevät mutaatiot, joita on lukuisia, vähentävät solujen energiatuotantoa, mutta kuolevat yksilön mukana. Somaattiset mutaatiot liitetään usein syöpätauteihin. Mutaatiot, jotka syntyvät naisen lisääntymissoluissa eli munasoluissa siirtyvät seuraavalle sukupolvelle, missä mutaatio voidaan havaita joko uutena mtDNA polymorfiana tai tuhoisana mtDNA sairautena (Wallace, 1994). Tällaisten ituradan mtDNA-mutaatioiden on osoitettu esittävän tärkeää roolia tietyissä sairauksissa kuten jo mainitussa *Leberin perinnöllisessä*

näköhermorappeumassa, äidiltä perityssä diabeteksessa ja Leighin syndroomassa, joka on pyruvaattiaineenvaihdunnan häiriöön perustuva ja kuolemaan johtava keskushermostotauti (Carew & Huang, 2002).

Jotkut mtDNA:ssa olevista mutaatioista esiintyvät homoplasmisina, millä tarkoitetaan, että jokainen solussa oleva mtDNA sisältää saman nukleotidimuutoksen. Kuitenkin suurin osa sairautta aiheuttavista mutaatioista esiintyy heteroplasmisessa tilassa, jossa villityypin mtDNA ja mutatoitunut mtDNA esiintyvät yhdessä mitokondriossa vaihtelevina osuuksina (Finnilä ym., 1999). Kun solu jakautuu, syntyy mahdollisuus, että mutatoituneet mtDNA:t jakautuvat jompaankumpaan tytärsoluun. Täten ajan kuluessa mutatoituneen mtDNA:n osuus eri solulinjoissa voi ajautua kohti joko täysin mutatoitunutta tai normaalia mtDNA-pitoisuutta (homoplasmiaa), tätä prosessia kutsutaan replikaatiiviseksi segregatioksi (Wallace ym., 1999). Solun jakautumisessa tapahtuvasta sattumanvaraisesta mitokondrion ja sen genomin jakautumisesta ja siitä johtuen syntyneestä heteroplasmiaasta on seurausta erityinen kynnysvaikutus ("threshold effect") mtDNA-linkatuissa ihmissairauksissa. Tyypillisesti mutaatioiden täytyä nimittäin saavuttaa tietty prosenttiosuus, tavallisesti korkeampi kuin 60–80 %, ilmentääkseen patologisia seurauksia (Lightowers ym., 1997; Zeviani & Antozzi, 1997).

2.4.1 Mitokondriaalinen DNA & vanheneminen

Vanheneminen on kiistatonta ja tiedetään, että mitokondrioilla ja etenkin mtDNA:lla on osansa tässä "ikävässä" prosessissa. Pitkäikäisyys näyttäisi olevan maternaalisesti perittyä, mikä osaltaan tukee mtDNA:n roolia ikääntymisprosessissa (Niemi ym., 2003). Ikääntymisen seurauksena pistemutaatiot ja häviämät mtDNA:ssa kasaantuvat kudostyyppistä riippuen sekä ihmisillä, apinoilla että jyrsijöillä. On tutkittu, että mtDNA:n mutaatiot aiheuttaisivat nisäkkäiden ikääntymistä sekä ennenaikaisia ikääntymiseen liittyvien fenotyyppien ilmentymistä kuten painonlaskua, ihonalaisen rasvakudoksen vähenemistä, hiusten lähtöä, köyryselkäisyyttä, osteoporoosia, anemiaa, alentunutta hedelmällisyyttä ja sydämenlaajenemaa. (Trifunovic ym., 2004.) Mitokondrioissa tapahtuva oksidatiivinen fosforylaatio on suurin vapaiden

happiradikaalien aiheuttaja, mikä edelleen vahvistaa mitokondrioiden ja mtDNA:n asemaa vanhenemiseen johtavana tekijänä. Polymorfiat mtDNA:ssa saattavat aiheuttaa hienoisia muutoksia koodattavissa proteiineissa ja siten muutoksia myös oksidatiivisen fosforylaation säätelyssä sekä vapaiden radikaalien tuotossa.

Hapetusreaktioissa ja hengitysketjussa tapahtuu normaalistikin jonkin verran elektronien vuotoa. Elektronit vuotavat mitokondrioiden ulkopuolelle esim. happi- ja hydroksyyli-radikaaleina. Terveellä ihmisellä elimistö kykenee antioksidanttien ja glutationeja sisältävän entsyymijärjestelmän avulla sieppaamaan vapaat radikaalit ja estämään elektronivuodon aiheuttamat vauriot. Elimistön puolustusmekanismien pettäessä vapaat radikaalit sitoutuvat nopeasti solujen makromolekyyleihin. Lipidiosien hapettuminen eli härskiintyminen solukalvoilla ja soluorganelleissa johtavat soluvaurioihin. Myös DNA:han sitoutuneet happiradikaalit vahingoittavat DNA:ta ja aiheuttavat geenivirheitä. Vanhenemista edesauttavat erityisesti keskushermoston soluissa tapahtuvat happiradikaalien aiheuttamat vauriot. Normaalisti vanhenemisestä johtuen myös mitokondriot vanhenevat ja elektronivuoto lisääntyy samalla, kun antioksidanttien ja niiden tapaan toimivien entsyymien kyky siepata vapaat radikaalit huononee, mistä johtuen soluvaurioiden määrä kasvaa. Monien tautien kohdalla on pystytty todistamaan syy-yhteys vapaisiin radikaaleihin. Keskushermoston ja erityisesti hermosolujen tai -kudoksen rappeutumisesta johtuvia sairauksia on monia, joista tunnetuimpia ovat Alzheimerin tauti, Parkinsonin tauti ja monet syöpätaudit. (Saarela, 2000.)

Vaikka vanheneminen ja mtDNA on yhdistetty toisiinsa, myös pitkäikäisyyden ja mitokondriaalisten haploryhmien välisestä yhteydestä on raportoitu. MtDNA:n oletettu rooli pitkäikäisyyteen liittyen perustuu haploryhmien yleisyyksissä oleviin eroihin satavuotiaiden ja kontrollien välillä (Niemi ym., 2003). Niemen ym. (2003) tekemässä tutkimuksessa haploryhmät J, U ja K olivat 90- ja 91-vuotiaiden keskuudessa yleisimpiä, sitä vastoin taas haploryhmä H oli keski-ikäisten kontrollipotilaiden sekä pikkulasten kohdalla yleisempi. Haploryhmän J kohdalla on myös muun muassa satavuotiaissa italialaisissa havaittu sama yleisyys kuin Niemenkin tutkimuksessa (De Benedictis ym., 1999; De Benedictis ym., 2000). Eroavaisuudet mtDNA-haploryhmien

yleisyyksissä 90–91-vuotiaiden ja kontrollien (keski-ikä 40,5 vuotta) välillä viittaavat siihen, että joko lievästi haitalliset polymorfiat lyhentävät elinikää nuoremmalla ryhmällä tai edulliset polymorfiat pidentävät vanhemman ryhmän elinikää. Niemen ym. (2003) tutkimuksen pohjalta on syytä puoltaa edullisia polymorfioita ja niiden myötävaikuttavaa roolia vanhenemisen prosessissa mitokondrioissa ja mtDNA:ssa.

2.4.2 Mitokondriaalisen DNA:n mutaatiot & syöpä

Mitokondriaalisten virheiden on pitkään epäilty olevan merkittävässä roolissa syövän kehittämisessä ja etenemisessä. Jo yli 70 vuotta sitten Otto Warburg oli uranuurtajana syöpätutkimuksissa. Tutkimuksissaan hän raportoi mitokondriaalisen hengitysketjun muutoksista, joiden taustalla olivat syöpäsolut ja oletettu mekanismi, jolla selittyy syöpäsolujen kasvu syövänmuodostusprosessissa. Warburgin tutkimusten virstanpylväs oli hänen hypoteesinsa siitä, että päätapahtumana karsinogeneesissä olisi vaurion kehittyminen hengitysketjun koneistoon, jonka tuloksena korvaavan glykolyyttisen ATP:n tuotanto kiihtyy. Lopulta pahanlaatuiset solut tyydyttäisivät energian tarpeensa tuottamalla suuret määrät tarvitsemaansa ATP:tä ennemmin glykolyyttisillä mekanismeilla kuin oksidatiivisen fosforylaation kautta. (Carew & Huang, 2002; Warburg, 1956.) Tapahtumaa Warburg alkoi kutsua ”aerobiseksi glykolyysiksi” (Brandon ym., 2006).

Warburgin havainnot saivat monet tutkijat analysoimaan mitokondriaalisia toimintoja tuumorisoluihin. Tutkimukset paljastivat, että mitokondrioiden määrä ja oksidatiivisen fosforylaation aktiivisuus olivat yleisesti vaimennussäädelyjä monissa syövässä, kun taas lähetti-RNA:n (mRNA) tasot tietyissä mtDNA:n koodaamissa geneeissä olivat ylisäännöstelltyjä (Brandon ym., 2006).

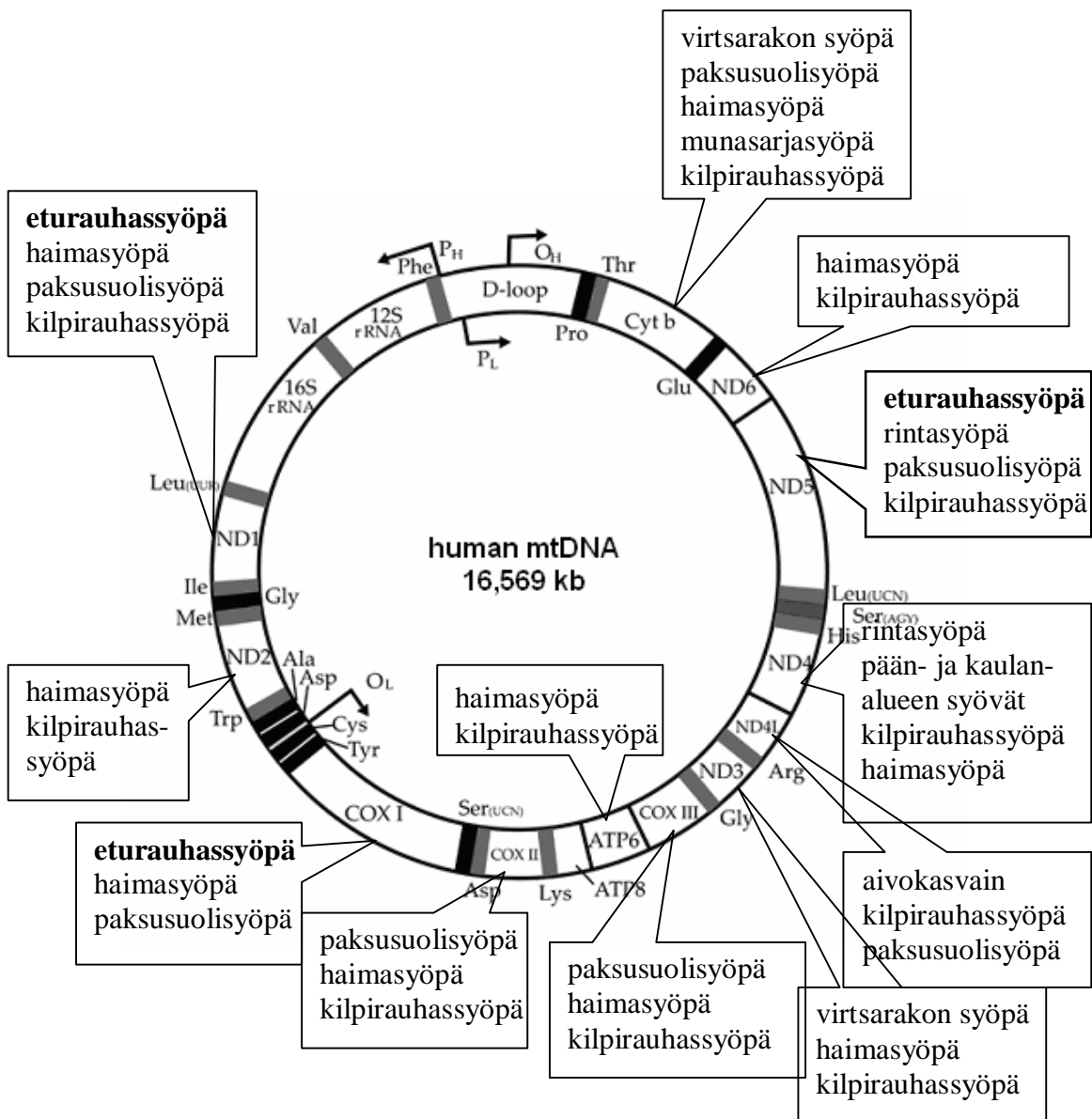
ATP:n muodostamiseksi normaalisolut käyttävät oksidatiivista fosforylaatiota, täten syöpäsolujen käyttäytyminen olisi täysin päinvastainen tapahtuma niiden kuluttaessa suuret määrät glukoosia tyydyttääkseen energiantarpeensa. Erot normaali- ja syöpäsolujen energiametaboliassa muodostavat biokemiallisen perustan sille, miten syövän parantamiseksi kehitettäisiin hoitoja, jossa tapettaisiin selektiivisesti syöpäsolut

ja sen seurauksena niiden luontainen kompromissina kehitetty hengitystila. (Carew & Huang, 2002; Hockenbery, 2002.)

Tutkimukset somaattisista mtDNA:n mutaatioista ovat nousseet tärkeäksi näkökulmaksi syöpätutkimuksessa, koska kyseiset mutaatiot ovat toiminnallisesti tärkeitä ja/tai niitä voitaisiin mahdollisesti käyttää biosensoreina kasvainten havaitsemisissa (Parr ym., 2006). Mitokondriaalisessa DNA:ssa sattuneet mutaatiot ja lisääntynyt oksidatiivinen stressi ovat nousseet esiin erilaisissa syöpäsoluissa useissa itsenäisissä tutkimuksissa (Carew & Huang, 2002). Useat mtDNA:n mutaatiot onkin identifioitu monenlaisiin erityyppisiin ihmisillä esiintyviin syöpiin. Kasvaimissa olevat mtDNA:n mutaatiot voidaan jakaa kahteen pääluokkaan: 1) vakavat mutaatiot, jotka rajoittavat oksidatiivisen fosforylaation toimintaa, lisäävät vapaiden happiradikaalien tuotantoa ja edistävät tuumorisolujen jakautumista ja 2) lievemmät mutaatiot, jotka sallivat kasvaimien sopeutumisen uuteen ympäristöön (Brandon ym., 2006). On siis mahdollista, että mtDNA:n mutaatiot saattavat aiheuttaa toiminnallisia muutoksia elektronien siirtoketjekompleksin alayksikköproteiineissa tavalla, joka johtaa elektronivirran kahtia jakautumiseen ja lisääntyneeseen reaktiivisten happiradikaalien tuotantoon. Reaktiivisten happiradikaalien kohtuullisen lisääntymisen on todettu stimuloivan solun proliferaatiota ja mitokondriaalista biogeneesiä. Endogeenisesti reaktiivisten happiradikaalien lisääntyminen antaa jatkuvia ärsykeitä solun proliferaatiolle ja mikä tärkeintä voi aiheuttaa lisävahinkoja sekä mtDNA:lle että tuman DNA:lle, mikä johtaa syövän kehittymiseen ja geneettiseen epävakaisuuteen (Carew & Huang, 2002).

Löydettyjen syöpää aiheuttavien mutaatioiden on havaittu olevan sekä mtDNA:n ei-koodaavalla- että koodaavalla alueella ja suurin osa mutaatioista ilmentyy homoplasmisina luonnossa (Chatterjee ym., 2006). Kuvassa 2.4.2 voidaan nähdä eri syöpätyyppien linkkautuminen mitokondriaalisen genomien eri kohtiin mtDNA:n mutaatioista johtuen. Runsaana esiintyviä homoplasmisia pistemutaatioita mitokondriaalisessa DNA:ssa on löydetty useista kasvaimista esiintymistiheyksien vaihdella paksusuolisyövän 70 %:sta eturauhassyöpätapauksien 15 prosenttiin (Chen ym., 2003; Nishikawa ym., 2001). Moninkertaiset homoplasmiset mutaatiot mtDNA:ssa

vaikuttaisivat olevan yleisiä ihmisillä esiintyvissä tuumoreissa. Seitsemästä tai useammasta mutaatiosta samassa tuumorissa on raportoitu glioblastoomissa, munasarjasyövissä, eturauhassyövissä sekä niin ikään maksasolukarsinoomissa (Chen ym., 2003). Syövässä homoplasmiset somaattiset mutaatiot tapahtuvat useasti hypervaihtelevilla alueilla (HVS-I ja HVS-II) ja nukleotidimuutokset ovat useimmissa tapauksissa identtisiä ituradassa havaittuihin polymorfioihin (Dakubo ym., 2006). Somaattisia mutaatioita homoplasmisessa tai heteroplasmisessa muodossa esiintyy syöpäpotilaiden kaikenlaisissa kudoksissa ja ruumiin nesteissä (Chatterjee ym., 2006).



Kuva 2.4.2. Mitokondriaalisessa genomissa havaitut erilaisia syöpiä aiheuttavat mutaatiot sen eri alueilla. (Mukaiillen Chatterjee ym. (2006), figure 1.)

Tiedetään myös, että apoptoosilla on kriittinen rooli syövän kehittymisessä ja soluissa syöpää ehkäisevien aineiden vasteessa (Chatterjee ym., 2006), täten mutaatiot ja virheet mtDNA:ssa aiheuttaisivat apoptoosin estymistä (Mizumachi ym., 2008). Monet tuman DNA:n koodaamista esiapoptoottisista proteiineista mukaan lukien sytokromi c, apoptoosia indusoiva tekijä (AIF), endonukleaasi G ja smac/DIABLO ovat normaalisti mitokondriossa, missä ne toimittavat tunnettuja tai vielä tunnistamattomia fysiologisia toimintoja. Kun nämä apoptoottisen signaalin kulkua edistävät proteiinit vapautuvat mitokondriosta, käynnistyy biokemiallisten tapahtumien sarja, joka johtaa apoptoottisten signalointi kaskaadien aktivointiin. (Carew & Huang, 2002.) Apoptoosin säännöstely tapahtuu mitokondriaalisen läpäisevän siirtymähuokosen kautta (Brandon ym., 2006).

2.4.2.1 mtDNA:n mutaatiot & eturauhassyöpä

Eturauhassyövän kohdalla taudin geneettinen karakterisointi on keskittynyt aiemmin lähinnä tuman genomiin ja sen geeneihin. Harvinaisia substituutiomutaatioita on raportoitu muutamissa syöpägeneeissä ja tuumorisuppressorigeeneissä ja ne on usein yhdistetty eturauhassyövän etenemisen myöhäisiin vaiheisiin (Chen ym., 2002). Tiedetään myös, että periytyvinä geenien ilmentymisessä määritellyt kuitenkin perimästä riippumattomat muutokset edistävät eturauhasessa pahanlaatuista muutosta ja eturauhassyövän etenemistä (Xie ym., 2007). Nämä geneettisistä muutoksista eroavat epigeneettiset muutokset tulevat siis esille DNA-sekvenssin muuttumatta ja ne säätelevät geenin ekspressiota. Yksi esimerkki näistä epigeneettisistä muutoksista on promoottorialueen hypermetylaatio.

Mitokondrion ainutlaatuisesta genetiikasta johtuen sekä toiminnallisesti tärkeän oksidatiivisen fosforylaation ja apoptoottisen kontrolloinnin takia mtDNA on saanut eturauhassyöpätutkimuksessa yhä enemmän nykyisin huomiota. Kun tiedetään, että mitokondriaalisesta DNA:sta puuttuvat histonit ja sillä on rajoittuneet DNA:n korjausmekanismit, voivat mutaatiot kasaantua aikojen kuluessa erityyppisiin kudoksiin kaikkialle elimistössä, mukaan lukien eturauhaseen (Dong, 2006). Eturauhassyövälle kuten muutamalle muullekin syöväälle on ensisijaisesti tunnusomaista apoptoosin

vastustaminen. Tiedetään, että mitokondrio on avainroolissa apoptoosin toiminnassa, joten voidaan olettaa, että mutaatiot mtDNA:ssa vahingoittavat apoptoosia sääteleviä toimintoja. Muille syöville, kuten esimerkiksi leukemialle, lymfoomille ja kivessyövälle, tärkein tunnuspiirre sitä vastoin on liiallinen solujen jakautuminen (Booker ym., 2006). Viimeaikaisten tutkimusten mukaan on saatu uskottavia tuloksia siitä, että mtDNA:n mutaatioilla on tärkeä rooli eturauhassyövän etiologiassa.

2.4.2.1.1 Eturauhassyövässä raportoiduista mtDNA-mutaatioista

Jessie ym. (2001) raportoivat eturauhassyöpätapauksissa erittäin yleisinä löydettyistä heteroplasmisista deleetioista mutatoituneessa mtDNA:ssa. He havainnoivat, että deleetiot lisääntyivät iän myötä ja siten ne eivät mahdollisesti olekaan ainoastaan merkki vanhenemisestä vaan ne olisivat myös syy vanhenemiselle. Tuhoutuneiden mtDNA-molekyylien aina vaan kasautuessa mitokondriot tuottavat yhä enemmän haitallisia happiradikaaleja ja vahingoittavat solun rakenneosia (Jessie ym., 2001). Dong (2006) raportoi eturauhassyövässä esiintyvistä laajoista somaattisista mutaatioista mtDNA:n koodaavilla alueilla. Mutaatioita mtDNA:ssa on havaittu myös eturauhasen epiteelinsisäisissä neoplasiavaurioissa, joiden uskotaan olevan eturauhassyövän esiasteita. Kasvaimet usein tuottavat lisääntyneessä määrin vapaita happiradikaaleja ja mtDNA:n mutaatiot, jotka inhiboivat oksidatiivista fosforylaatioita voivat lisätä vapaiden happiradikaalien tuottoa ja siten edistää kasvaimen muodostumista (Dong, 2006). Chen ym. (2002) raportoivat äärimmäisen korkeista sekvensoinnin myötä löytyneistä somaattisten mutaatioiden (90 %) esiintymistiheyksistä D-loop-alueella. Kun taas Jerónimo ym. (2001) sekvensoivat tutkimuksissaan D-loop-alueen ja havaitsivat, että vaikkakin mitokondriaaliset mutaatiot (identifioitiin 3/16 potilaasta) ovat vähemmän yleisiä eturauhassyövässä, niitä esiintyy syövän kehityksen varhaisessa vaiheessa ja ne voidaan erottaa ruumiinnesteistä, virtsasta ja plasmasta, varhaisessa vaiheessa potilailta, joilta löytyi mutatoitunutta mtDNA:ta primaarikasvaimista.

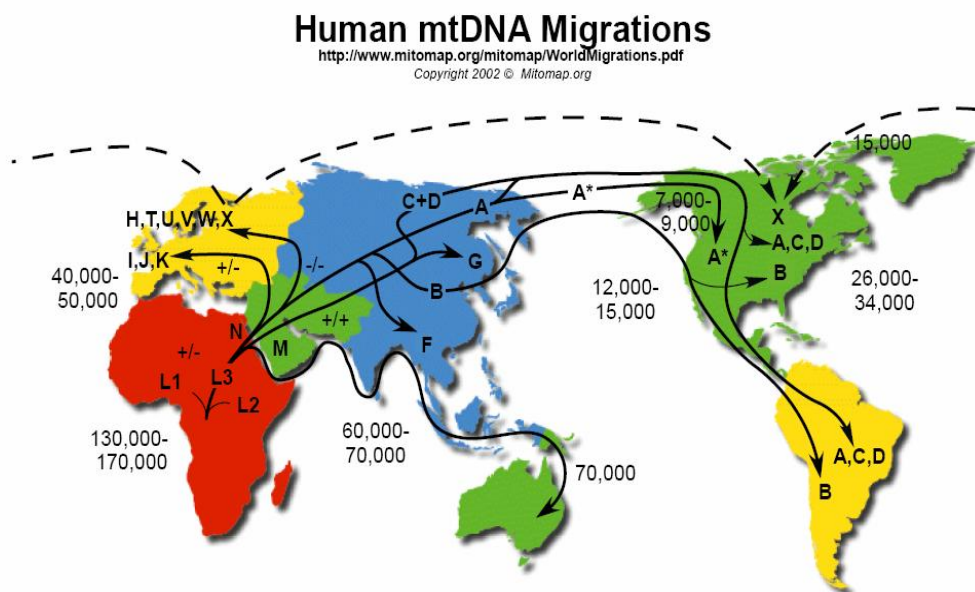
Petros ym. (2005) raportoivat tutkimuksissaan havaituista merkittävästi lisääntyneistä toiminnallisesti tärkeän sytokromioksidaasi alayksikkö I:sen (COI)-mutaatioista 11–12 prosentissa kaikista eturauhassyöpätapauksissa. Eturauhassyöpäsolujen, jotka sisälsivät oksidatiivista fosforylaatiota inhiboivan ja vapaiden happiradikaalien tuotantoa

kasvattavan mtDNA-mutaation, käyttöönotto lisäsi COI-mutaatioiden *in vivo*-kasvua. Jos eturauhassyöpä on tavallisin kliininen seuraamus COI-mutaatiosta, voi edellä mainitut COI-mutaatiolöydökset eturauhassyövässä selittää niiden yleisyyden tavallisessa väestössä. Eturauhassyöpään kuolee lähinnä keski-ikäiset tai vanhemmat miehet, mutta mtDNA on yksinomaan äidiltä perittyä. Näin ollen voidaan olettaa, että tuhoisilla COI-mutaatioilla, jotka aiheuttavat eturauhassyövän, olisi ainoastaan minimaalinen vaikutus mutatoituneen mtDNA:n geneettiselle kelpoisuudelle (Petros ym., 2005). Petroksen ym. (2005) tekemästä tutkimuksesta käy ilmi, että havaittu ituradan mtDNA:n COI-mutaatio voidaan yhdistää eturauhassyöväälle altistavaksi tekijäksi, täten mtDNA:n mutatoitunut COI-geeni on yksi eturauhassyövän syöpägeneistä. Myös Gallardo ym. (2006) raportoivat COI-geenialueella havaitusta mutaatiosta G6267A, joka on joko seurausta kasvaimen kehittymisestä tai se on altistava tekijä, joka johtaa kasvaimen kehittymiseen. Mutaation G6267A löytyminen syöpäpotilaiden normaali kudoksesta antaa ymmärtää, että kyseessä olisi ituradan välittämä mutaatio ja täten sillä olisi altistava rooli kasvaimen kehittämisessä (Gallardo ym., 2006).

Gómez-Zaera ym. (2006) analysoivat tutkimuksissaan mtDNA-sekvenssin muutoksista, häviämistä ja uudelleenjärjestäytymistä, eturauhasnäytteistä potilailta, joilla oli todettu eturauhassyöpä. Vaikka he eivät löytäneet poikkeavuuksia mtDNA:n määrässä tai pituudessa, he identifioivat 94 sekvenssimuutosta tutkituista näytteistä. Monet niistä olivat homoplasmisia. Tutkimuksissaan he löysivät mtDNA:sta kahdeksan somaattista muutosta viideltä potilaalta seitsemästätoista analysoidusta, joten tulos osoittaa, että analysoiduilla eturauhassyöpäpotilailla esiintyy tietty määrä mtDNA:n muutoksia. Samassa tutkimuksessa Gómez-Zaera ym. (2006) tutkivat eturauhassyöpäpotilaiden rakkularauhasia, jotka paljastivat kantavansa samaa mtDNA-sekvenssin muutosta kuin eturauhanenkin. Tämä saattaa viitata siihen, että näiden muutosten patogeeninen rooli olisi vähäpätöinen. Toisaalta ne voivat myös osallistua patogeenisen prosessin aikaisiin vaiheisiin kombinaatiossa muiden eturauhasessa, mutta ei rakkularauhasessa, olevien tekijöiden kanssa (Gómez-Zaera ym., 2006).

2.5 Mitokondriaaliset haploryhmät

Ihmisten mitokondriaalisen genomien vaihteluita käytetään nykyisin rutiininomaisesti ihmisten maternaalisten sukujuurien tutkimiseen ja päättelemiseen. Menetelmänä käytetään erityisesti RFLP- (restriction fragment length polymorphism) tutkimuksia mtDNA:n koodaavilla alueilla ja sekvensointia kontrollialueen (ei-koodaavan alueen) eri osissa (Macaulay ym., 1999). Useimmat fylogeneettiset analyysit perustuvat mtDNA:n kontrollialueen ensimmäisen hypervaihtelevan segmentin (HVS-I) sekvenssivaihteluihin (Richards ym., 1998; Macaulay ym., 1999). Mitokondriaaliset haploryhmät onkin siten luokiteltu mitokondriaalisessa DNA:ssa olevien tunnettujen polymorfioiden avulla. Kuvasta 2.5.a. nähdään eri haploryhmien levittäytymistä maailmalla.



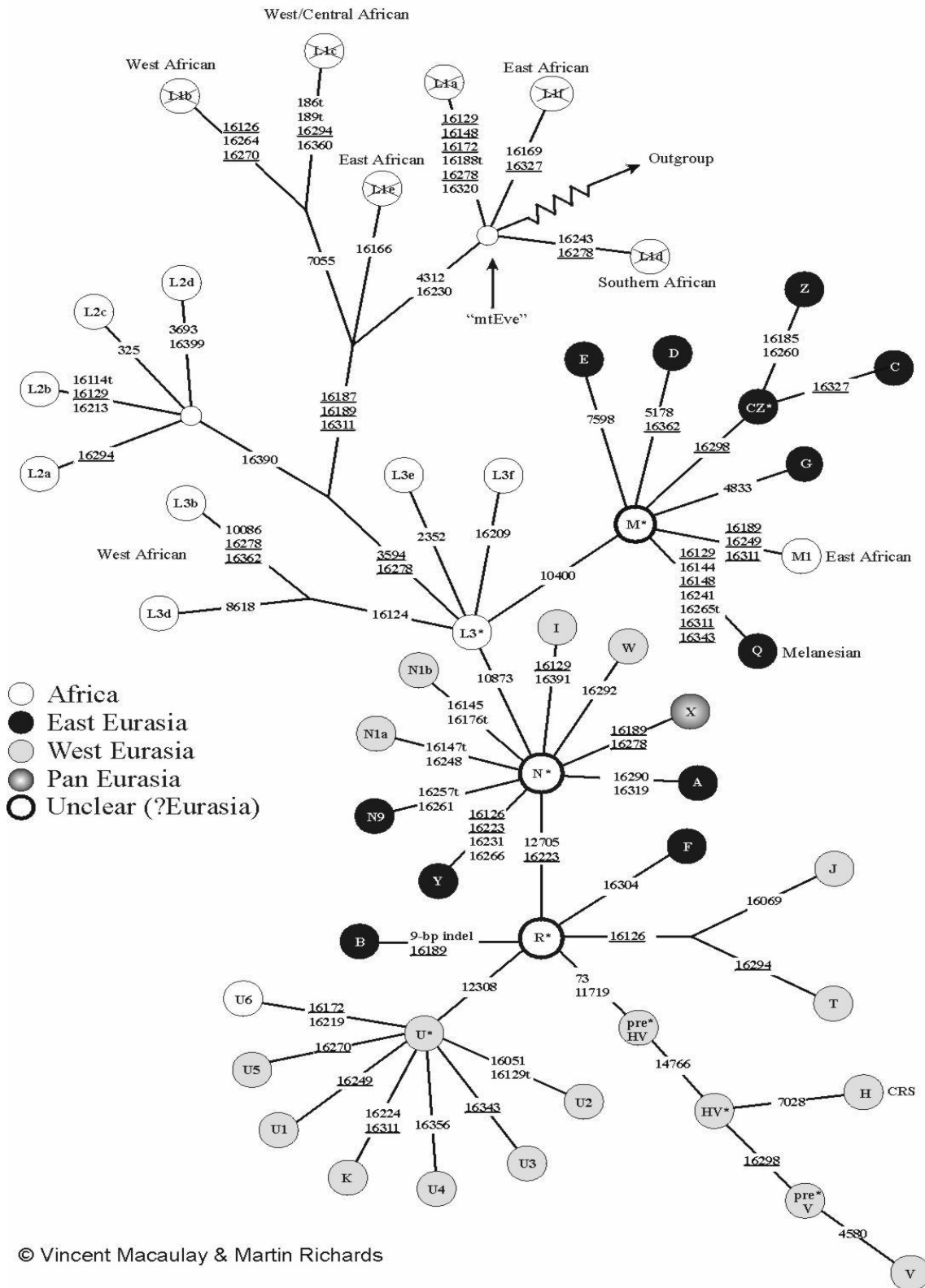
Kuva 2.5.a. Mitokondriaalisten haploryhmien levittäytyminen maapallolla (<http://www.mitomap.org/WorldMigrations.pdf>; 1.6.2007)

Tuman DNA:n mutaationopeuteen verrattuna mtDNA:n vastaava on 10–20 kertaa nopeampaa. Tämän seurauksena mitkä tahansa kaksi mtDNA:ta voi erota toisistaan 10–66 nukleotidin verran (Finnilä ym., 2000). Keskimäärin kahden eri ihmisen mtDNA:t eroavat toisistaan 25 emäsparin verran (Chinnery ym., 1999). Korkean

mutaatioasteen tuloksena ihmispopulaatio on yleisesti jaettu väestöspesifisiin mtDNA-polymorfioihin. Koska mtDNA periytyy ainoastaan äidin kautta, mutaatiot ovat kasautuneet järjestelmällisesti levittäen maternaalisia sukujuuria. Täten mtDNA:n polymorfioiden mukaan ihmispopulaatio voidaan jakaa maantieteellisesti eri alueille. Haploryhmien yleisyys vaihtelee erilaisten etnisten ryhmien välillä (Niemi ym., 2003). Eurooppalainen väestö jakautuu lähes yksinomaan yhdeksään eri haploryhmään, joita ovat: H, I, J, K, T, U, V, W ja X. Kun sitä vastoin haploryhmät A, B, C, D ja E ovat ominaisia aasialaisille ja haploryhmät L1, L2 ja L3 ovat ominaisia Afrikan väestölle (Wallace ym., 1999). Kaikki haploryhmät on luokiteltu myös suuremmiksi kokonaisuuksiksi, haploklustereiksi. Eurooppalaisesta väestöstä löydetty haploryhmät voidaan sisällyttää neljään haploklusteriin: HV, UK, TJ ja WIX (N) (Finnilä ym., 2001). Macaulay & Richardsin fylogeneettisen puun avulla (kuvassa 2.5.b) voidaan määrittää ihmisten mtDNA:ssa olevista polymorfioista tunnetut haploryhmät.

2.5.1 Eurooppalaisten haploryhmien identifiointi

Käyttämällä korkean erotuskyvyn RFLP-tutkimuksia Torroni ym. (1994) määrittivät neljä klusteria (H, I, J ja K) pohjoisamerikkalaisten kesken, joilla oli eurooppalaiset esivanhemmat. Tätä myöhemmin Richards ym. (1996) tekivät kontrollialueen ensimmäisestä hypervaihtelevasta segmentistä (HVS-I) fylogeneettisen verkoston ja identifioivat kuusi suurinta mtDNA-klusteria eurooppalaisten välillä. Myöhemmin Torroni ym. (1996) käyttivät hyväkseen kontrollialueen polymorfioita kahteen skandinaaviseen väestöön ja identifioivat viisi täydentävää klusteria (T, U, V, W ja X). Näin kaikki määritellyt yhdeksän klusteria käytännöllisesti katsoen yhdessä kattavat kaikki tutkitut eurooppalaiset mtDNA:t (kuvassa 2.5.b merkitty vaalean harmailla ympyröillä ”West Eurasia”). Myöhemmissä tutkimuksissaan Richards ym. (2000) esittivät olettamuksen, että Lähi-itä alueena olisi alkuperänä suurimmassa osassa Euroopassa esiintyvissä geneettisissä variaatioissa.



Kuva 2.5.b. Macaulay & Richardsin fylogeneettinen puu ihmisen mtDNA-sekvenssistä (Macaulay & Richardsin haploryhmäpuu) (www.stats.gla.ac.uk/~vincent/images/skeleton07-08-02.jpg; 1.6.2007)

2.5.2 Mitokondriaaliset haploryhmät Suomessa

Mitokondriaalisen DNA:n sekvenssivaihtelut suomalaisessa väestössä osoittaa korkeaa homogeenisyyttä (Finnilä ym., 2001). Niemen ym. (2003) tekemässä tutkimuksessa, jossa tutkittiin mitokondriaalisten DNA-polymorfioiden yhteyttä pitkäikäisyyteen suomalaisessa väestössä, määritettiin haploryhmät aikuisille kontrollihenkilöille, jotka oli kerätty Tampereen alueelta. Yleisimmät Suomessa havaitut haploryhmät olivat: H (51 %), U (20,5 %), J (6,3 %), K (6,0 %), T (5,5 %) ja V (4 %) (Niemi ym., 2003). Huomioitavaa on se, että muualla Euroopassa haploryhmää U tavataan noin seitsemässä prosentissa väestöä, mutta Suomessa se siis näyttäisi esiintyvän moninkertaisena (20,5 %) (Finnilä ym., 2000; Meinilä ym., 2001). Muiden kuin haploryhmä U:n kohdalla Suomessa näyttäisi haploryhmien yleisyys noudattavan muissa Euroopan väestöissä havaittua kuviota ja selvä länsieuraasialainen malli polymorfioiden suhteen on havaittavissa. Kuitenkin silti Suomenkin kokoisessa maassa voidaan havaita maantieteellisiä eroja mtDNA haploryhmien yleisyyksissä (Meinilä ym., 2001).

3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää

- 1) Löytyykö suomalaisilta eturauhassyöpää sairastavilta miehiltä yhteistä, mitokondriaalista tekijää, joka altistaa eturauhassyövälle, kun näytteinä on sekä perhetaustaisia että satunnaisesti eturauhassyöpään sairastuneita miehiä. Toisin sanoen tutkittiin voidaanko suomalaisten syöpänäytteiden perusteella löytää jokin tietty mitokondriaalinen haploryhmä riskitekijäksi eturauhassyövälle kuten aiempi yhdysvaltalainen tutkimus (Booker ym., 2006) on ehdottanut.
- 2) Onko perinnöllisesti ja satunnaisesti eturauhassyöpään sairastuneiden miesten kesken merkittäviä eroja haploryhmien välillä.
- 3) Löytää suomalaisista eturauhassyöpänäytteistä mahdollisia muita mutaatioita/polymorfioita mitokondriaalisen DNA:n sekvensoinnin myötä.

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Näytteet

Aineistona käytettiin suomalaisten eturauhassyöpäperheiden näytteitä (n=164), joiden valintakriteeriksi on määritelty, että perheessä on oltava vähintään kaksi eturauhassyöpään sairastunutta ensimmäisen tai toisen asteen sukulaista. Keskiarvo perheissä olevista sairastuneista oli 2.8 (vaihteluväli 2–7) ja keski-ikä sairauden diagnosoinnissa oli 63 vuotta (vaihteluväli 43–86). Jokaisesta perheestä näyte on otettu nuorimmalta saatavilla olevalta sairastuneelta. Aineistona käytettiin myös näytteitä satunnaisesti valituilta miehiltä, joilla on diagnosoitu eturauhassyöpä vuoden 1995 jälkeen Tampereen yliopistollisessa sairaalassa (n=93). Sekä eturauhassyöpäperheiden että satunnaisesti valittujen miesten kohdalla näytteinä käytetty genomisen DNA on eristetty veren lymfosyyteistä käyttäen Puregene kittiä (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) noudattamalla valmistajan ohjeita. Kontrollinäytteinä toimivat Suomen Punaisen Ristin anonyymit verenluovuttajat, joita verrattiin eturauhassyöpää sairastavien näytteisiin. Kontrollinäytteiden kohdalla ei tarvinnut tässä työssä tehdä genomisen DNA:n eristystä eikä sekvensointia, koska tutkimuksessa käytettiin aiemmassa tutkimuksessa (Minkkinen, 2006) olleita kontrollinäytteitä sekä niistä saatuja haploryhmäanalyysin tuloksia.

Työn edetessä löytyneen muutoskohdan vuoksi 400 kontrollinäytteen sekvensointi löydetyin muutoskohdan osalta tehtiin tässä työssä, koska Minkkisen (2006) työssä käytettiin yhden nukleotidin polymorfia muutos (SNP) -testiä, joten kyseistä nukleotidipaikkaa 7996 ei ollut aiemmin erikseen sekvensoitu. Sekvensointi tehtiin alukeparilla mt 7981 & mt 8305 (taulukko 4.2).

Tässä tutkimuksessa käytetyt eturauhassyöpänäytteet ovat luonnollisesti ainoastaan miehiltä otettuja näytteitä, kun sitä vastoin kontrollinäytteet voivat olla sekä miehiltä että naisilta saatuja verinäytteitä.

4.2 Mitokondriaalisen DNA:n monistaminen

Sekvensointia varten veren lymfosyyteistä eristettyä DNA:ta on monistettava PCR:n (polymerase chain reaction) avulla. PCR menetelmänä perustuu lämpötilavaihteluita kestävään DNA-polymeraasiin, jolla pystytään eksponentiaalisesti monistamaan DNA:ta alukeparien rajaamalta alueelta. Monistuksessa käytetyt alukeparit on suunniteltu siten (Minkkinen, 2006), että alukkeet rajaavat tietyn kokoisen (emäspari, bp) jakson mitokondriaalista DNA:ta, jolloin monistuva alue ei sisällä muuta kuin mitokondriaalista DNA:ta. Taulukkoon 4.2 on merkitty tutkimuksessa käytetyt alukeparit, alukkeiden kiinnittymislämpötilat (T_a) sekä monistettavien PCR-tuotteiden oikeat koot. Reaktioissa näytteinä käytettiin kuivattuja DNA-templaatteja, joita oli 100ng/näyte. Reaktiot tehtiin 49 μ l:n tilavuuksissa, 96-kuoppalevyillä. Reaktioihin tuli 3 μ l magnesiumkloridia ($MgCl_2$), 1 μ l 10 mM dNTP-seosta (Fermentas), 3 μ l kumpaakin alukeparin 10 mM aluketta (Proligo), 0,3 μ l AmpliTaq Gold- entsyymiä (Applied Biosystems) sekä 5 μ l 10-kertaista PCR-puskuria, joka täydentää entsyymin toiminnan. Reaktioissa käytetty ohjelma on alukkeiden kiinnittymislämpötilojen (T_a) vaihdellessa noudattanut tiettyä kaavaa: alkudenaturointi 94 °C, 4 minuuttia, jonka jälkeen 30 sykliä siten, että denaturointi tapahtuu 94 °C:ssa, 1 minuutti, alukkeiden kiinnittymislämpötilana on käytetty kullekin alukeparille taulukossa merkittyä lämpötilaa T_a (°C), 1 minuutti ja pidennyslämpötilana 72 °C, 2 minuuttia, jonka jälkeen lopullinen kiinnittyminen käyttäen tiettyä kiinnittymislämpötilaa, 1 minuutti sekä lopullinen elongaatio 72 °C:ssa, 10 minuuttia. PCR:llä monistettujen tuotteiden oikeellisuus eli koko (bp) tarkastettiin geelielektroforeesilla. Elektroforeesissa käytettiin agarosigeeliä, joka ajettiin TBE-puskurissa ja DNA:n detektoimisessa toimi etidiumbromidi, joka lisättiin suoraan geeliin.

Kaikilla taulukossa 4.2 merkityillä alukepareilla on sekvensoitu ainoastaan perhetaustaisista eturauhassyöpänäytteistä 95 näytettä. Alukeparit mt 1627 & mt 1788, mt 9914 & mt 10557 ja mt 13309 & mt 13943 eivät sisällä yhtään haploryhmiä määrittävistä polymorfiapaikoista, joten ajan säästämiseksi niillä ei sekvensoitu 69 perhetaustaista eturauhassyöpänäytettä eikä satunnaisesti sairastuneista 93 eturauhassyöpänäytettä.

Taulukko 4.2. PCR-monistuksessa käytetyt alukkeet, T_a-lämpötilat ja PCR-tuotteiden koot (Minkkinen, 2006).

mtDNA:n haploryhmiä määrittäviä polymorfia- markkereita	Alukkeet	T_a (°C)	PCR- tuotteen koko(bp)
	Mt 1627 (5'-CCAACTTACACTTAGGAGATTTC-3') Mt 1788 (5'-GCGGTACTATATCTATTGGCGC-3')	57	162
4580	Gln (5'-GAATCGAACCCATCCCTGAG-3') Mt 5025 (5'-GGGTAATTGAGGAGTATGCTAAG-3')	57	685
7028	Mt 6912 (5'-GCAGTGCTCTGAGCCCTAGG-3') Mt 7133 (5'-GGCGTAGGTTTGGTCTAGGG-3')	60	222
	Mt 7981 (5'-CCTGCGACTCCTTGAAGTTG-3') Mt 8305 (5'-GCTTTACAGTGGGCTCTAGAGG-3')	55	325
	Mt 9914 (5'-GCCGCCGCCTGATACTGGCAT-3') Mt 10557 (5'-GGGAGGATATGAGGTGTGAGCG-3')	57	643
10873	Mt 10708 (5'-CAATCTCCAACACATATGGCCTA-3') Mt 10973 (5'-GTCAGGTAGTTAGTATTAGGA-3')	53	266
11719	Mt 11618 (5'-GCATACTCTTCAATCAGCCACAT-3') His(12183) (5'-CTGTTGTCAGATTCACAATCTG-3')	53	566
12308	FR 51 (5'-ACTTCTAGCAAGCCTCGCTAACCTC-3') FR 44 (5'-TTTGGGTTGTGGCTCAGTGTCAGT-3')	57	718
12705	Mt 12459 (5'-ATCCACCTTTATTATCAGTCTC-3') Mt 12789 (5'-GGATATAATTCTACGCCCTC-3')	53	331
	Mt 13309 (5'-GCATTCCCTGCACATCTGTACCC-3') Mt 13943 (5'-GTGCGGTGTGTGATGCTAGG-3')	55	635
14766	Mt 14678 (5'-CTCGCACGGACTACAACCACGAC-3') Mt 14950 (5'-GTGGGCGATTGATGAAAAG-3')	53	273
D-loop alue (useita markkereita)	Mt 15976 (5'-TCCACCATTAGCACCCAAAG-3') OK-2L (5'- TAAATAATAGGATGAGGCAGGAATCAAAGACA- 3')	55	754

4.3 PCR-tuotteiden puhdistus

Sekvensointia varten monistetut PCR-tuotteet puhdistettiin 96-kuoppaisilla Acro Prep Filter-levyillä (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA) käyttäen Perfect Vac Manifold- vakuumlaitteistoa. Vakuumlaitteiston käyttö perustuu alipaineeseen.

Alipaineessa kuopassa oleva ultrafiltraatiomembraani poistaa PCR-tuotteesta oligonukleotidit sekä vapaat nukleotidit jättäen puhdistettavan tuotteen kalvolle, josta se voidaan eluoida veteen. Eluutio tehtiin 20–23 μ l:aan H₂O:ta. Puhdistetut näytteet säilytettiin pakkasessa -20 °C:ssa.

4.4 Sekvensointi-PCR

Sekvensointi-PCR:ää varten täytyi kustakin DNA-näytteestä tehdä kaksi erillistä reaktioseosta vastakkaisilla alukkeilla eli toinen sekvenssin lukusuunnassa ja toinen tähän nähden käänteisessä suunnassa. Vastakkaisina alukkeina käytetään kussakin näytteessä niitä alukkeita, joilla näyte oli alun perin PCR:llä monistettu. Käyttämällä vastakkaisia alukkeita voidaan huomattavasti vähentää PCR:stä tai tulosten virheellisestä tulkinnasta johtuvien sekvenssivirheiden mahdollisuutta. Sekvensointi-PCR:ssä käytettiin Big Dye terminaattori- menetelmää (Applied Biosystems). Sekvensointi-PCR tehtiin jäällä 96-kuoppalevyillä ja reaktioseoksen tilavuus oli 10 μ l. Puhdistetun PCR-tuotteen määrää vaihdeltiin 2 ja 4 μ l:n välillä paremman sekvenssin saamiseksi. Reaktion suunnasta riippuen tiettyä aluketta, jonka pitoisuus oli 0,8 μ M, tuli reaktioseokseen 2 μ l:aa, reaktioon tuli myös 3 μ l:aa 2,5-kertaista sekvensointipuskuria ja 1 μ l Big Dye terminaattori- entsyymiä. Reaktio ajettiin PCR-koneessa ohjelmalla: 27 sykliä 30 sekuntia 96 °C, 20 sekuntia 50 °C ja 4 minuuttia 60 °C sekä lopuksi yhden minuutin jäähditys, 11 °C.

4.5 Sekvensointireaktioiden puhdistus etanolisaostuksella

Sekvensointireaktiot, jotka olivat 96-kuoppalevyillä, puhdistettiin etanolisaostuksella ei-kiinnittyneistä komponenteista ennen niiden varsinaista sekvensointia. Saostuksessa käytettiin 3M natriumasetaattia ja absoluuttista etanolia suhteessa 1:25, jolloin yhden näytteen kokonaistilavuus 26 μ l:aa. Natriumasetaatti–absoluuttinen etanoli -lisäyksen jälkeen näytteitä inkuboitiin 10 minuuttia huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen 96-kuoppalevyjä sentrifugoitiin 3500 rpm:llä 30 minuuttia, jonka jälkeen supernatantti poistettiin imeyttämällä se paperiin, jota tehostettiin sentrifugoimalla 96-kuoppalevyä

ylösalaisin 2000 rpm:llä 1 minuutti. Lopuksi 96-kuoppalevyillä olevat näytteet pestiin 70 % -etanolilla, jota lisättiin kuoppiin 100 µl:aa ja sentrifugoitiin 3500 rpm:llä 10 minuuttia. Sentrifugoinnin jälkeen etanoli poistettiin näytteistä. Ja jotta etanoli saatiin mahdollisimman tarkasti pois, sentrifugoitiin 96-kuoppalevy ylösalaisin paperin päällä 2000 rpm:llä 1 minuutti. Tämän jälkeen kuivattuja näytteitä voitiin säilyttää -20°C ennen sekvensointia. Jos sekvensointi tehtiin heti, kukin näyte suspensoitiin 12 µl:aan HiDi formamidia, jonka jälkeen denaturointi 95°C:ssa 3 minuuttia. Itse sekvensointi tehtiin ABI Prism 3100 DNA-analysaattorilla.

4.6 Sekvensointidatan analysointi

Sekvensointitulokset analysoitiin Sequencher 4.6-ohjelmalla. Sequencher 4.6-ohjelma vaatii jonkin verran manuaalista työtä sekvenssien kohdalla, mm. huonon sekvenssin karsimista pois näytteen alku- ja loppupäistä sekä nukleotidien tarkistusta. Manuaalisen tarkistuksen jälkeen näytesekvenssit olivat helpommin tulkittavissa ja tietyllä alukeparilla sekvensoiduista näytepareista voitiin tehdä päällekkäiset sekvenssit (contigit) käyttäen lukusuuntaista ja sitä vastaan olevaa sekvenssiä. Näytteissä havaitut mutaatiot/polymorfiat tarkastettiin manuaalisesti sekvenssien elektroferogrammeista.

4.7 Analysointia sekvensointitulosten pohjalta

Haploryhmämäärittelyssä käytettiin Macaulay & Richardsin fylogeneettisen puun (haploryhmäpuu), joka pohjautuu ihmisen mtDNA-sekvenssiin, polymorfismeja (kuva 2.5.b). Puussa tiettyä haaraa seuraten saatiin kukin näyte määritettyä tiettyyn haploryhmään. Macaulay & Richardsin haploryhmäpuussa eri haploryhmät on merkitty ympyröiden sisälle isoilla kirjaimilla. Cambridgen viitesekvenssi (Cambridge reference sequence, CRS) (Andrews ym., 1999) on puussa sijoitettu haploryhmään H. Jotta näyte siis voitiin merkitä kuuluvaksi haploryhmään H, oli sen seurattava Cambridgen viitesekvenssiä kyseisen haaran joka pisteessä. Muussa tapauksessa näyte kuului johonkin muuhun kuin H-haploryhmään ja tällöin uusi haploryhmä määritettiin

näytteessä havaittujen polymorfioiden mukaan Macaulay & Richardsin haploryhmäpuun muita markkereita apuna käyttäen.

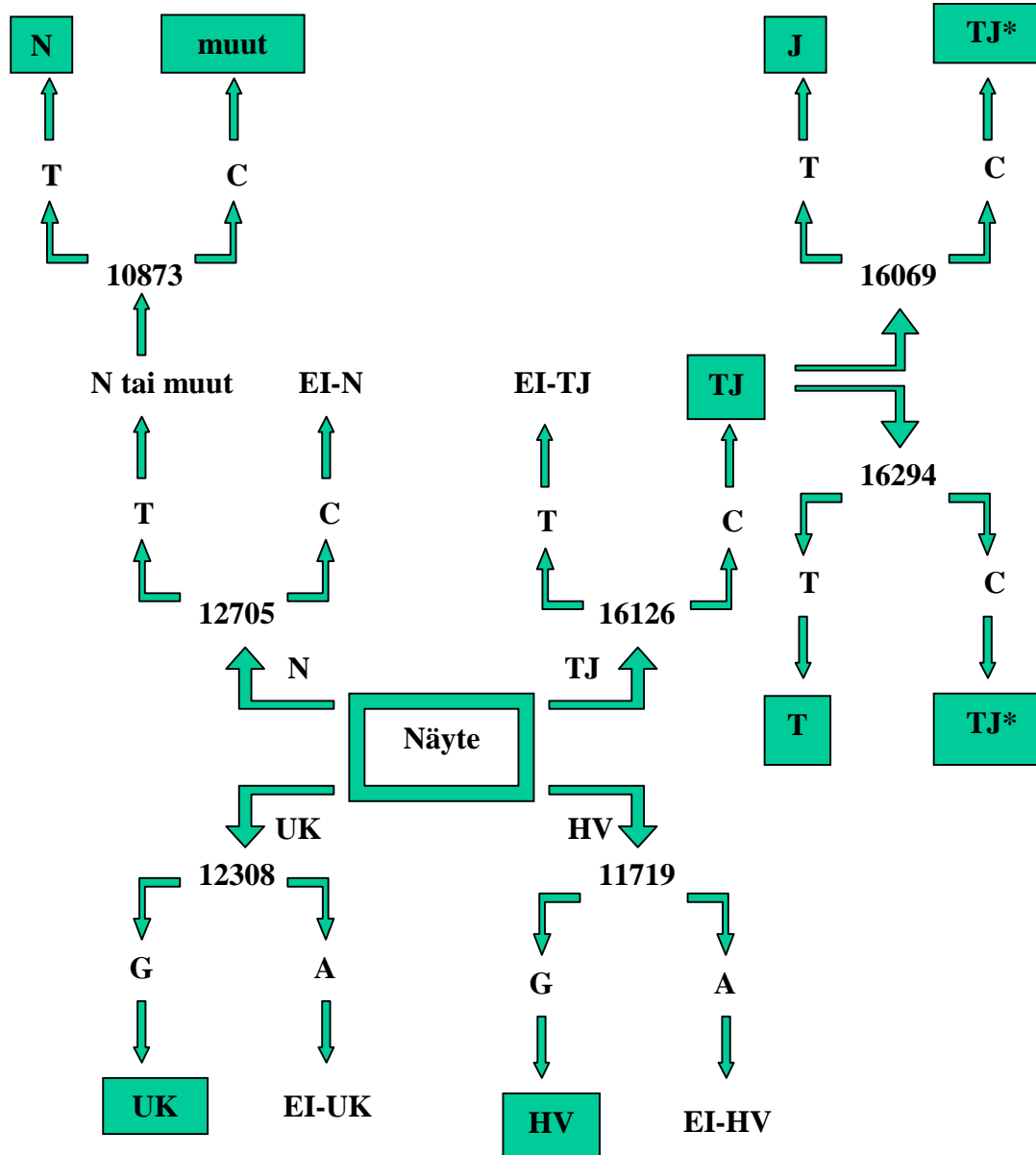
Macaulay & Richardsin haploryhmäpuussa (kuva 2.5.b) alleviivattuja markkereita hypervaihtelevilla alueilla käytettiin niiden toistuvien mutaatioiden ja mahdollisten takaisinmutaatioiden vuoksi vain niissä tapauksissa, kun muita markkereita ei ollut mahdollista käyttää. Puussa on myös yksi alleviivaamaton markkeri, jota ei myöskään käytetty sen korkean vaihtelevuuden vuoksi, nukleotidijärjestyksessä kohdalla 73. Täten määriteltäessä näyte HV-haploklusteriin käytettiin siis vain markkeria 11719.

Osalle näytteistä saatiin määritettyä ainoastaan haploklusteri, koska haploryhmämäärittämisessä näytettä ei saatu enää linkattua mihinkään haploryhmään. Tällaiset näytteet merkittiin kuuluvaksi *-ryhmään, esim. haploklusterissa UK perhetaustaisten syöpänäytteiden osalta neljä näytettä jäi ilman haploryhmämerkintää, jolloin niitä merkittiin UK*-merkinnällä (taulukko 5.2). Kaikille näytteille ei saatu edes määritettyä haploklusteria, tällöin nämä näytteet merkittiin kuuluvaksi ”luokittelemattomiin” näytteisiin. Näytesarjaan kuului myös näytteitä, joiden haploryhmä ei kuulunut yleisimpiin Euroopassa havaittuihin haploryhmiin. Nämä näytteet määriteltiin kuuluvaksi ryhmään ”muut”.

4.7.1 Haploklusterimäärittäminen

Näytteille määritettiin ensin haploklusterit Macaulay & Richardsin haploryhmäpuun markkereiden avulla. UK-haploklusterin markkerina toimi A12308G, TJ-klusterin markkeri oli T16126C, HV-klusteriin käytettiin markkeria 11719G, C12705T oli markkerina N-haploklusterille ja näytteille, jotka luokiteltiin kuuluviksi haploryhmään ”muut” markkerina toimi 10873C. Kuvassa 4.7.1 on kuvattu yksi tapa määrittellä näytteen haploklusteri merkittävistä polymorfioista hyväksi käyttäen. Jos näyte johtaa kohtaan EI- jokin tietty klusteri, jatketaan johonkin toiseen klusteriin niin kauan kunnes näytteelle löytyy määriteltävä haploklusteri. Kuvasta 4.7.1 myös nähdään että, jos TJ-haploklusterissa näytteen yhdistäminen ei onnistu kumpaankaan haploryhmään T tai J,

näyte johtaa ryhmään TJ*. Samalla periaatteella myös muissa klustereissa on syntynyt *-merkittyjä näytteitä.



Kuva 4.7.1. Diagrammi haploklustereiden määrittämiseen.

4.7.2 Haploryhmämääritys

Haploryhmämäärityksessä jatkettiin siitä mihin haploklusterimäärityksessä jäätin, eli kunkin näytteen kohdalla käytettiin hyväksi edellä saatuja tietoja haploklusterista ja

jatkettiin haploryhmämäärittystä sen klusterin osalta, johon näyte oli jo linkattu. Haploklusterit jakautuivat seuraaviin haploryhmiin U (U1-U6) ja K (UK-haploklusteri), T ja J (TJ-haploklusteri), H ja V (HV-haploklusteri), W, I ja X (N-haploklusteri), ”muut” sekä ”luokittelemattomat”. Tässä tutkimuksessa U1-U6-haploryhmiin linkatut näytteet liitettiin yhdeksi U-haploryhmäksi.

Haploklusterin HV kohdalla mahdollisia haploryhmiä oli enemmän kuin H ja V-ryhmät, näiden lisäksi siis myös ryhmät pre*HV, HV* ja pre*V. Haploryhmän H diagnosoinnissa käytettiin markkeria 7028T ja haploryhmän V kohdalla markkeria 4580A. Markkeri 11719G toimi myös markkerina ryhmälle pre*HV kuten se toimi koko HV-haploklusterin diagnosoinnissa. Näytteet, joilla oli molemmat polymorfiat 11719G ja 14766C, mutta ei haaran muita merkittyjä polymorfioita, kuuluivat ryhmään HV*. Jos näytteestä löytyi kaikki seuraavat polymorfiat: 11719G, 14766C ja T16298C, mutta ei 4580A, merkittiin näyte kuuluvaksi ryhmään pre*V. Haploklustereiden UK, TJ ja N kohdilla toimittiin samoin Macaulay & Richardsin haploryhmäpuuhun merkittyjen polymorfioiden kohdalla ja saatiin sitä kautta näytteille määritettyä kyseisten haploklustereiden osalta omat haploryhmät.

Sekvensointia tehtäessä törmättiin yhteen ongelmaan nukleotidikohdassa 16189, joka sijaitsee D-loop-alueella, jossa tiedetään olevan myös suurin osa haploryhmiä määrittävistä polymorfiapaikoista. Kyseinen nukleotidikohdassa 16189 oleva emäsmuutos T→C oli yksi haploryhmiä määrittävistä polymorfioista. D-loop-aluetta sekvensoitiin normaalisti alukeparilla mt15976 ja OK-2L, mutta polymorfiaa määrittävä T16189 sijaitsi neljä C:tä ja viisi C:tä olevien C-toistojaksojen välissä, jolloin muutos T16189C olisi saanut aikaan kymmenen C:n mittaisen toistojakson. Tällä alueella tyypillisesti havaittiin heteroplasmiaa, jolloin C-toistojen määrä vaihtelisi 8 ja 12 välillä. Tämän C-toistojakson seurauksena olevan heteroplasmian vuoksi sekvenssiä olisi mahdoton lukea sen loppuosan suhteen. Tämän ongelman ratkaisemiseksi ja täyden sekvenssin saamiseksi niissä näytteissä, joissa havaittiin emäsmuutos T16189C, otettiin käyttöön D-loop-alueelle kolmas aluke mt 16504 (5'-CCAGATGTCGGATACAGTTCAC-3'), jolla sekvensoitiin puuttuva osa 16189 nukleotidiparin kohdalta käänteiseen suuntaan (Minkkinen, 2006).

4.8 Tilastolliset analyysit

Lopullinen tulosten analysointi tehtiin tilastollisia merkitsevyyksiä mittaavia kaavoja käyttäen. Kaavojen avulla laskettiin näytteille määritellyille haploklustereille ja haploryhmille Z- ja P-arvot sekä ristitulosuhteet eli odds ratio-arvot (OR:t). Z-arvot laskettiin olettaen kuvaajan noudattavan normaalijakaumaa nolasta yhteen kaavalla:

$$Z = \frac{p_1 - p_2}{\sqrt{p^*(100 - p^*)\left(\frac{1}{n} + \frac{1}{m}\right)}} \sim N(0,1), \quad p^* = \frac{np_1 + mp_2}{n + m},$$

jossa p_1 - ja p_2 - arvot ovat tiettyjen näytteiden prosentiosuudet sekä n - ja m - arvot ovat näytteiden kokonaismäärät tietyssä näytteryhmässä.

Ristitulosuhteet eli OR-arvot laskettiin kaavalla:

$$OR = \frac{\frac{a}{c}}{\frac{b}{d}} \leftrightarrow \frac{(a \times d)}{(c \times b)}$$

Esimerkkinä perheittäin periytyvät syöpänäytteet vs. kontrollinäytteet haploklusterille HV:

	perhenäytteet	kontrollit
HV	68	212
EI-HV	96	188

$$OR = (68 \times 188) \div (96 \times 212) \approx 0,6281.$$

Niille OR-arvoille, joista tuli tulokseksi edellä lasketulla kaavalla nolla, laskettiin uudelleen lisäämällä arvoihin 0,5. Näitä tapauksia olivat sellaiset haploryhmät, joissa ei saatu yhdistettyä lainkaan kyseiseen ryhmään kuuluvia näytteitä. Tällaisia tapauksia oli muun muassa HV-klusteriin kuuluvissa ryhmissä kuten pre*HV tai HV*.

Esimerkkinä perheittäin periytyvät syöpänäytteet vs. kontrollinäytteet haploklusterille pre*HV:

	perhenäytteet	kontrollit
pre*HV	1	0
EI-pre*HV	163	400

Lisätään arvoihin 0,5, jolloin saadaan:

	perhenäytteet	kontrollit
pre*HV	1,5	0,5
EI-pre*HV	163,5	400,5

$$OR = (1,5 \times 400,5) \div (163,5 \times 0,5) \approx 7,3486.$$

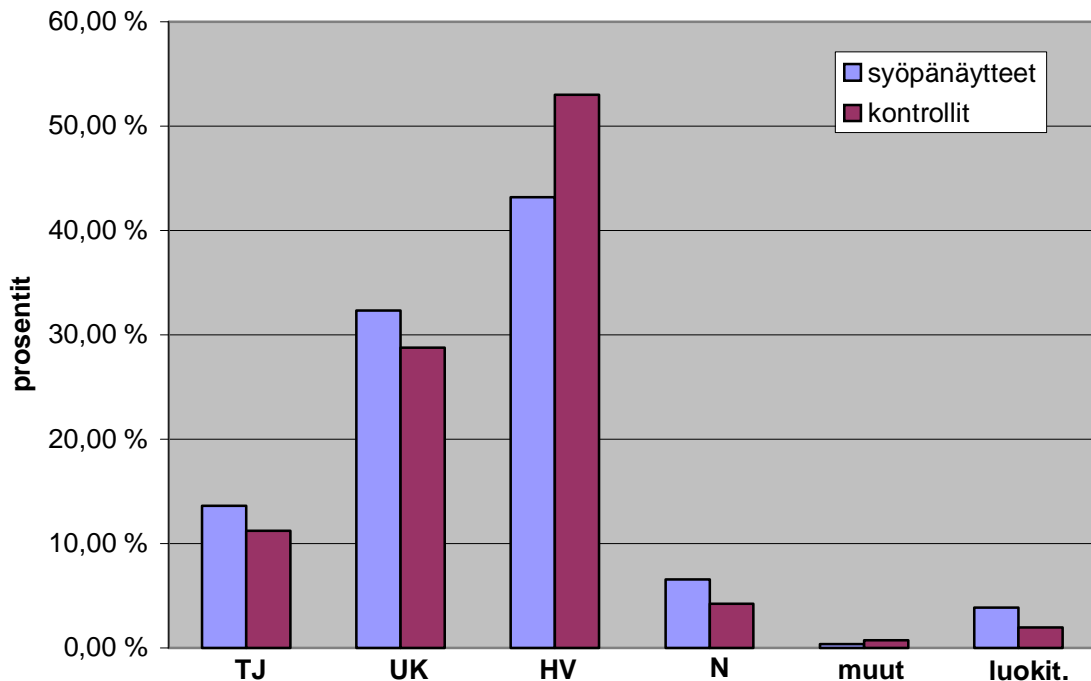
5 TULOKSET

5.1 Haploklusterianalyysi

Haploklusterimäärittämisessä käytettyjen 257 syöpäpotilaan yleisin haploklusteri oli HV sen ollessa yleisin myös 400 potilasta käsittäneen kontrolliryhmän kohdalla (kuva 5.1.a), prosenttien jakautuessa 43,2 % ja 53,0 %. Haploklusteri HV oli kuitenkin selvästi yleisempi kontrolliryhmällä (53,0 %). Haploklusteri HV:n yleisyys selittynee sillä, että tavallisesti haploryhmä H on yleisin eurooppalaisessa väestössä täten myös suomalaisilla. Muiden haploklusterien (TJ, UK, N ja ”luokittelemattomat”) paitsi ryhmän ”muut” kohdalla tilanne oli toisinpäin eli ne olivat yleisempiä syöpäpotilailla. Merkittävin ero syöpä- ja kontrollinäytteiden kohdalla saatiin, jo käsitellyn haploklusteri HV:n lisäksi, haploklusteriin UK, joka on selvästi (32,3 % vs. 28,75 %) muita haploklustereita yleisempi syöpäpotilailla kuin kontrolliryhmällä. UK-haploklusterin suuret näytemäärät kokonaismääriin verrattuna molemmissa ryhmissä on tavallista suomalaisissa näytteissä, koska haploryhmä U:n tiedetään olevan Suomessa moninkertaisesti yleisempi kuin muualla Euroopassa.

Yhdistämällä perhetaustaiset ja satunnaisesti valitut eturauhassyöpäpotilaiden näytteet kuten kuvassa 5.1.a saatiin yleisesti kuva mitokondriaalisista haploklusteritekijöistä, jotka saattavat olla yhteydessä eturauhassyövän kehittymisen kanssa. Kuva 5.1.a ei kuitenkaan vielä paljasta mahdollisia eturauhassyövän riskitekijöitä, koska pylväiden erot syöpäpotilaiden ja kontrollien välillä vaikuttavat samansuuntaisilta haploklusterista riippumatta, lukuun ottamatta haploklustereita HV ja ”muut”. Yhdistettyjä syöpänäytteitä (kuvassa 5.1.a) oli tarkasteltava myös erikseen, jotta nähdään olisiko perinnöllisesti ja satunnaisesti eturauhassyöpään sairastuneiden potilaiden mitokondriaalisten haploklustereiden välillä eroja.

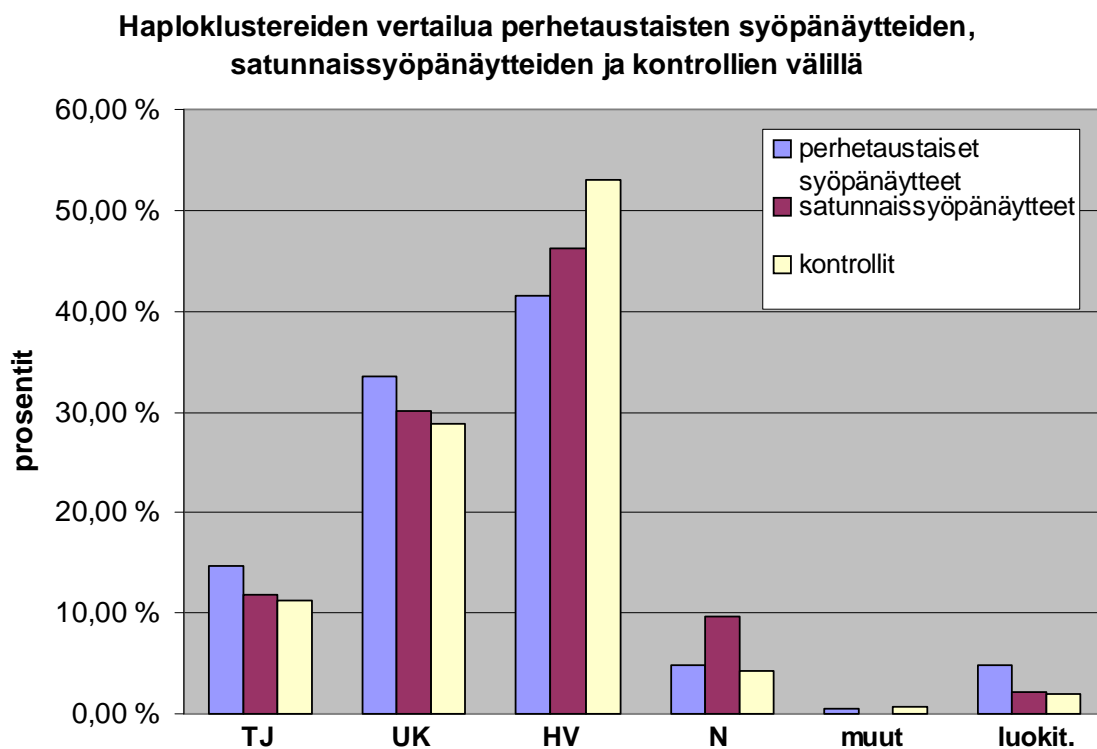
Haploklustereiden vertailua syöpä- ja kontrollinäytteillä



Kuva 5.1.a. Pylväskaavio eturauhassyöpäpotilaiden (n=257) yleisimmistä haploklustereista verrattuna kontrollipotilaiden (n=400) vastaaviin.

Kun vertailtiin perhetaustaisten eturauhassyöpänäytteitä ja satunnaisesti valittujen eturauhassyöpää sairastavien potilaiden näytteitä kontrolliryhmän näytteisiin (kuva 5.1.b), tilanne näyttäisi olevan sama kuin syöpäpotilaiden näytteitä verrattaessa kontrollinäytteisiin (kuva 5.1.a). Yleisin haploklusteri oli edelleen HV. UK-haploklusterin kohdalla erot olivat merkittävimmät niin, että se oli perhe- ja satunnaisnäytteissä yleisempi kuin kontrolliryhmän näytteissä, kuitenkin niin, että haploklusteri UK oli perhetaustaisten syöpänäytteiden kohdalla vielä yleisempi kuin satunnaisesti valituissa syöpänäytteissä. Myös haploklusterit TJ sekä N olivat kontrollinäytteitä yleisempiä sekä perhe- että satunnaisnäytteissä. Koska haploklusterissa N satunnaisesti valittujen eturauhassyöpänäytteiden merkittävästi muita näyteryhmiä suurempi määrä nousi pylväskaaviosta esiin, on ilmiötä syytä tarkastella haploryhmämäärityksessä tarkemmin, jossa haploklusterit jaettiin haploryhmiin. Samoin kuvasta 5.1.b nähdään, että luokittelemattomien näytteiden kohdalla perhetaustaisten syöpänäytteiden määrä on suurempi kahteen muuhun näyteryhmään

verrattuna. Haploryhmämäärittämisessä saataisiin lisäselvitystä edellä mainituille eroille eri näyteryhmien välillä. Oli myös huomioitava, ettei satunnaisesti sairastuneitten näytteiden joukosta löytynyt lainkaan ryhmään ”muut” kuuluvia näytteitä. Tässä vaiheessa on mainittava, että osa haploklustereihin yhdistetyistä näytteistä voi jäädä ilman haploryhmää tarkemmassa tarkastelussa, jolloin tällaiset näytteet luokiteltiin omiin ryhmiinsä.



Kuva 5.1.b. Pylväskaavio perhetaustaisten (n=164) ja satunnaisesti valittujen (n=93) eturauhassyöpää sairastavien potilaiden yleisimmistä haploklustereista verrattuna kontrollipotilaiden (n=400) vastaaviin.

5.2 Haploryhmäanalyysi

Taulukkoon 5.2 on merkitty tiettyihin haploryhmiin kuuluvien perhetaustaisten- ja satunnaisesti valittujen eturauhassyöpänäytteiden sekä kontrollinäytteiden kappalemäärät sekä tiettyihin haploklustereihin kuuluneiden näytteiden kokonaismäärät kussakin kolmessa ryhmässä.

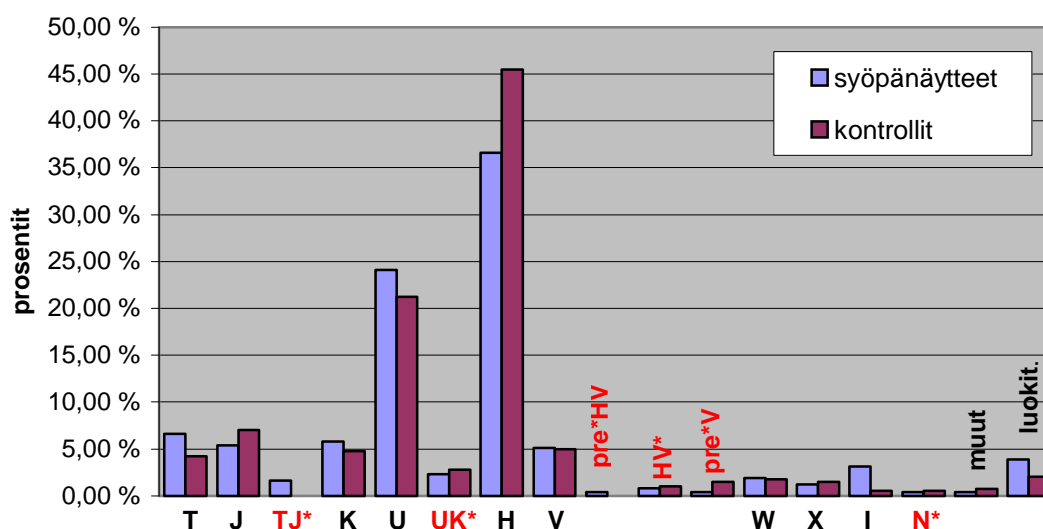
Taulukko 5.2. Haploryhmäanalyysin tulokset (perhenäytteet n=164, satunnaisnäytteet n=93 ja kontrollit n=400)

Klusteri	Haploryhmä	Perhenäytteet	Satunnaisnäytteet	Kontrollit
HV	H	56	38	182
	V	8	5	20
	pre*HV	1	0	0
	HV*	2	0	4
	pre*V	1	0	6
		total	68	43
UK	K	12	3	19
	U	39	23	85
	UK*	4	2	11
		total	55	28
TJ	T	11	6	17
	J	10	4	28
	TJ*	3	1	0
		total	24	11
N	W	2	3	7
	X	2	1	6
	I	4	4	2
	N*	0	1	2
		total	8	9
muut		1	0	3
luokit.		8	2	8

Taulukosta 5.2 nähdään, että luokittelemattomia näytteitä oli verrattain eniten perhetaustaisissa eturauhassyöpänäytteissä. Haploklustereiden sisällä määrittelemättömiksi jääneet näytteet on merkitty UK*, TJ* ja N*-merkinnöillä. Haploklusterissa HV markkereita oli enemmän kuin muissa klustereissa, sen vuoksi kyseisestä klusterista H- ja V- haploryhmien lisäksi merkinnät pre*HV, HV* sekä pre*V, joiden määritykset on kerrottu Materiaalit ja menetelmät -osiossa. Näytteet, jotka on luokiteltu kuuluviksi UK*-, TJ*-, N*-, pre*HV-, HV*- tai pre*V-ryhmiin on haploryhmiä koskevissa pylväskuvissa otettu huomioon, vaikkeivät ne varsinaisesti haploryhmämääritelmää vastaakaan. Kyseiset näytteet otettiin mukaan tuloksiin sen vuoksi, että niillä katsotaan olleen merkitystä tulosten kannalta ja niiden avulla voitaisiin mahdollisesti selvittää eroja syöpä- ja kontrollinäytteiden välillä.

Kuvassa 5.2.a on vertailtu haploryhmien osuuksia kaikkien tutkimuksessa käytettyjen eturauhassyöpä- ja kontrollipotilaiden välillä. Kuvassa 5.2.a ja 5.2.b mustalla fontilla on merkitty varsinaiset Euroopassa yleisimmät haploryhmät ja punaisella fontilla ryhmät, joissa näytteitä ei saatu haploklustereiden sisällä enää yhdistettyä kyseisen klusterin haploryhmiin. Kuvassa 5.2.a ryhmien TJ* ja pre*HV kohdalla kontrollipotilaista näytteitä ei löytynyt lainkaan kyseisiin ryhmiin. Kaaviosta (kuva 5.2.a) nähdään myös selvästi kuinka haploryhmät H ja U ovat Suomessa yleisimpiä riippumatta siitä sairastaako potilas eturauhassyöpää vai ei. H ja U haploryhmien yleisyys on kiistatonta muiden haploryhmäpylväiden jäädessä selvästi matalammiksi.

Haploryhmien vertailua syöpä- ja kontrollinäytteissä

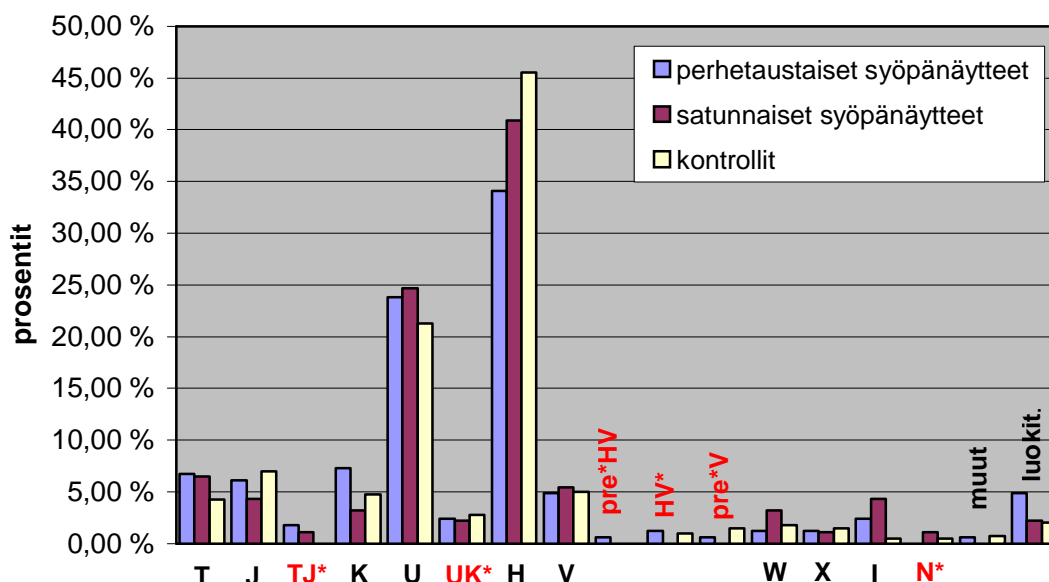


Kuva 5.2.a. Pylväskaavio Euroopassa yleisimpien haploryhmien vertailusta eturauhassyöpä- (n=257) ja kontrollipotilaiden (n=400) kesken. Punaisella fontilla on merkitty ryhmät, jotka eivät vastaa varsinaista haploryhmämääritelmää, mutta joihin saatiin linkattua näytteitä haploklusterimäärittäessä, muttei enää haploryhmämäärittäyksissä. Punaisella merkittyjen ryhmien on katsottu olevan tärkeitä tutkimuksen tulosten kannalta.

Kuvan 5.2.a haploryhmäanalyysissä kontrollinäytteissä selvästi yleisin haploryhmä oli H sen ollessa yleisin myös syöpänäytteiden kohdalla, eron kuitenkin ollessa huomattava (45,5 % vs. 36,6 %). Toiseksi yleisin haploryhmä sekä syöpä- että kontrollinäytteissä oli U, missä kuitenkin syöpänäytteiden määrä oli kontrollinäytteitä korkeampi erolla 24,1 % vs. 21,25 %. Haploryhmien T, U, I ja ”luokittelemattomat” kohdalla syöpänäytteiden pylväät olivat selkeästi korkeammat, kun taas päinvastainen tilanne oli haploryhmien J,

H ja pre*V kohdalla. Muiden haploryhmien osalta pylväskorkeudet sekä syöpä- että kontrollinäytteissä olivat lähellä toisiaan näytteiden lukumäärienkin jäädessä pieniksi. Haploryhmän I, joka kuuluu ryhmien W ja X lisäksi jo tarkastelussa olleeseen haploklusteriin N, kohdalla huomattiin aiemmin mainittu merkittävä ero syöpä- ja kontrollinäytteiden välillä (3,1 % vs. 0,5 %). Haploryhmien W ja X pylväiden ollessa melko tasaiset kummassakin tarkasteltavassa ryhmässä, oli selvää, että N-haploklusterin kohdalla nousseet erot syöpä- ja kontrollinäytteissä johtuivat siis haploryhmästä I.

Haploryhmien vertailua perhetaustaisten syöpänäytteiden, satunnaissyöpänäytteiden ja kontrollien välillä



Kuva 5.2.b. Pylväskaavio Euroopassa yleisimpien haploryhmien vertailusta perhetaustaisten (n=164) ja satunnaisesti (n=93) eturauhassyöpään sairastuneiden sekä kontrollipotilaiden (n=400) kesken. Punaisella fontilla kaavioon on merkitty ryhmät, jotka eivät vastaa varsinaista haploryhmämääritelmää, mutta joihin saatiin linkattua näytteitä haploklusterimäärittelyssä tehtäessä, muttei enää haploryhmämäärittelyssä. Punaisella merkittyjen ryhmien on katsottu olevan tärkeitä tutkimuksen tulosten kannalta.

Jotta tuloksista nähtiin mahdolliset erot perinnöllisten ja satunnaisesti eturauhassyöpään sairastuneiden kesken, tehtiin vielä yksi pylväskaavio (kuva 5.2.b), jossa näitä ryhmiä vertailtiin erikseen kontrollipotilaiden näytteisiin.

Vertailtaessa erikseen perhetaustaisia ja satunnaisesti valittuja eturauhassyöpänäytteitä sekä kontrollinäytteitä keskenään (kuva 5.2.b) huomattiin, että yleisimmässä haploryhmässä H perhetaustaisten syöpänäytteiden määrä oli huomattavasti pienempi kuin kahden muun näyteryhmän. Huomioitavaa kuitenkin oli, että luokittelemattomien näytteiden kohdalla nimenomaan perhetaustaisten syöpänäytteiden määrä taas vastaavasti oli korkeampi verrattaessa satunnaisesti sairastuneiden syöpänäytteisiin tai kontrollinäytteisiin. Haploryhmien T, U ja I kohdalla havaittiin sama ilmiö kuin verrattaessa kaikkia syöpänäytteitä kontrolleihin (kuva 5.2.a) eli kontrollinäytteiden määrä oli pienempi. Päinvastainen tilanne eli kontrollinäytteiden suurempi määrä huomattiin haploryhmissä J, H, pre*V ja ”muut”. Niin sanottuja haploryhmien ulkopuolelle jääneitä, eli ryhmiin TJ*, UK*, pre*HV, HV*, pre*V ja N* linkattuja, näytteitä oli kaikkiaan vähän. Kaikissa muissa edellä mainituissa ryhmissä paitsi UK*- ja pre*HV-ryhmissä näytteitä löytyi vain kahdesta näyteryhmästä. UK*-ryhmään linkkautui kaikkien kolmen näytesarjan näytteitä, kun taas pre*HV-ryhmän kohdalla näytteitä löytyi vain perhetaustaisilta syöpää sairastavilta. Satunnaisesti eturauhassyöpään sairastuneiden joukosta ei yksikään näyte linkkautunut ryhmiin HV*, pre*V ja ”muut”, joten näissä ryhmissä oli vain perhetaustaisten eturauhassyöpään sairastuneiden ja kontrollipotilaiden näytteet. Sen sijaan ryhmässä TJ* oli vain perhetaustaisen ja satunnaisesti eturauhassyöpään sairastuneiden näytteet ja ryhmässä N* sitä vastoin oli satunnaisesti eturauhassyöpään sairastuneiden ja kontrollipotilaiden näytteet.

Jotta voitaisiin tutkia tarkemmin perinnöllisesti ja satunnaisesti eturauhassyöpään sairastuneiden potilaiden mahdollisia haploryhmäsiintyvyyksien eroja, täytyy kuvaa 5.2.b tutkia vain näiden kahden ryhmän kesken. Suurimmat erot perhetaustaisten ja satunnaisesti eturauhassyöpään sairastuneiden kesken löytyivät haploryhmistä J, K, H, W, I ja ”luokittelemattomat”. Haploryhmissä J, K ja ”luokittelemattomat” perhetaustaisten syöpänäytteiden määrä oli suurempi ja sitä vastoin haploryhmissä H, W ja I satunnaisesti sairastuneiden osuus oli korkeampi. Edellä mainittujen erojen kuten muidenkin pylväskaavioissa havaittujen eroavaisuuksien oikein tulkitseminen vaatii tilastollisia analyysejä, jotta nähtäisiin olivatko ryhmien väliset erot tilastollisesti merkitseviä.

5.3 Tilastolliset analyysit tuloksista

Tilastolliset analyysit tehtiin kaikille pylväskaavioissa esitetuille haploklustereille ja -ryhmille kaikissa kolmessa näyteryhmässä. Alla oleviin taulukoihin (5.3.a–5.3.h) on laskettu kunkin neljän näyteryhmän haploklustereiden ja -ryhmien prosenttiosuudet (p/perhe, p/satunnais, p/kontrolli ja p/syöpäiset), Z-arvot, P-arvot, jotka määräytyivät Z-arvojen perusteella, ja lopuksi taulukkoon on laskettu OR-arvot. Kaikki laskut on laskettu Materiaalit ja menetelmät -osiossa esiteltyjen kaavojen mukaan.

Taulukko 5.3.a. Tilastolliset analyysit haploklustereiden vertailusta perhetaustaisten (n=164) ja satunnaisesti eturauhassyöpään (n=93) sairastuneiden kesken.

Klusteri	p / perhe	p / satunnais	Z	P (Z> z)	OR-arvo
HV	41,5	46,2	-0,7309	0,2327	0,8236
UK	33,5	30,1	0,5603	0,2877	0,1714
TJ	14,6	11,8	0,6295	0,2643	1,2779
N	4,9	9,7	-1,4851	0,0681	0,4786
muut	0,6	0	0,7539	0,2266	1,7156
luokit.	4,9	2,2	1,0718	0,1423	2,3333

Taulukko 5.3.b. Tilastolliset analyysit haploklustereiden vertailusta perhetaustaisten (n=164) eturauhassyöpää sairastavien ja kontrollinäytteiden (n=400) kesken.

Klusteri	p / perhe	p / kontrolli	Z	P (Z> z)	OR-arvo
HV	41,5	53	-2,4885	0,0064	0,6281
UK	33,5	28,75	1,125	0,1303	1,2505
TJ	14,6	11,25	1,1138	0,1327	1,3524
N	4,9	4,25	0,3291	0,3710	1,1554
muut	0,6	0,75	-0,1802	0,4285	0,8119
luokit.	4,9	2	1,8696	0,0308	2,5128

Taulukko 5.3.c. Tilastolliset analyysit haploklustereiden vertailusta satunnaisesti (n=93) eturauhassyöpään sairastuneiden ja kontrollinäytteiden (n=400) kesken.

Klusteri	p / satunnais	p / kontrolli	Z	P (Z> z)	OR-arvo
HV	46,2	53	-1,1757	0,1199	0,7626
UK	30,1	28,75	0,2599	0,3975	1,0676
TJ	11,8	11,25	0,1582	0,4371	1,0583
N	9,7	4,25	2,1093	0,0175	2,4139
muut	0	0,75	-0,8377	0,2011	0,6073
luokit.	2,2	2	0,0928	0,4630	1,0769

Taulukko 5.3.d. Tilastolliset analyysit haploklustereiden vertailusta kaikkien syöpänäytteiden ja kontrollien (n=400) kesken.

Klusteri	p / syöpäiset (n=257)	p / kontrolli	Z	P (Z> z)	OR-arvo
HV	43,2	53	-2,4544	0,0071	0,6742
UK	32,3	28,75	0,9666	0,1669	1,1822
TJ	13,6	11,25	0,9061	0,1825	1,2437
N	6,6	4,25	1,3353	0,0909	1,5958
muut	0,4	0,75	-0,5803	0,2808	0,5149
luokit.	3,9	2	1,4491	0,0737	1,9838

Taulukko 5.3.e. Tilastolliset analyysit haploryhmien vertailusta perhetaustaisten ja (n=164) ja satunnaisesti eturauhassyöpään (n=93) sairastuneiden kesken.

Haploryhmä	p / perhe	p / satunnais	Z	P (Z> z)	OR-arvo
H	34,1	40,9	-1,0877	0,1379	0,7505
V	4,9	5,4	-0,1754	0,4286	0,9026
pre*HV	0,61	0	0,7539	0,2266	1,7156
HV*	1,2	0	1,0576	0,1446	2,8769
pre*V	0,61	0	0,7539	0,2266	1,7156
U	23,8	24,7	0,1620	0,4364	0,9496
K	7,3	3,2	1,3491	0,0885	2,3684
UK*	2,4	2,2	0,1021	0,4602	1,1375
T	6,7	6,5	0,0619	0,4761	1,0425
J	6,1	4,3	0,6109	0,2709	1,4448
TJ*	1,8	1,1	0,4365	0,3300	1,1743
W	1,2	3,2	-1,1228	0,1314	0,3704
X	1,2	1,1	0,0719	0,4721	1,1358
I	2,4	4,3	-0,8458	0,1977	0,5563
N*	0	1,1	-1,3425	0,0901	0,1874
muut	0,6	0	0,7539	0,2266	1,7156
luokit.	4,9	2,2	1,0718	0,1423	2,3333

Taulukko 5.3.f. Tilastolliset analyysit haploryhmien vertailusta perhetaustaisten (n=164) eturauhassyöpää sairastavien ja kontrollinäytteiden (n=400) kesken.

Haploryhmä	p / perhe	p / kontrolli	Z	P (Z> z)	OR-arvo
H	34,1	45,5	-2,4793	0,0066	0,6211
V	4,9	5	-0,0606	0,4759	0,9744
pre*HV	0,61	0	1,5631	0,0590	7,3486
HV*	1,2	1	0,2308	0,4088	1,2222
pre*V	0,61	1,5	-0,8672	0,1929	0,4029
U	23,8	21,25	0,6590	0,255	1,1562
K	7,3	4,75	1,2147	0,1122	1,5831
UK*	2,4	2,75	-0,2084	0,4174	0,8841
T	6,7	4,25	1,2201	0,1112	1,6198
J	6,1	7	-0,3883	0,3489	0,8627
TJ*	1,8	0	2,7122	0,0033	17,3591
W	1,2	1,75	-0,4566	0,3240	0,6931
X	1,2	1,5	-0,2558	0,3990	0,8107
I	2,4	0,5	2,0384	0,0208	4,975
N*	0	0,5	-0,9071	0,1822	0,4845
muut	0,6	0,75	-0,1802	0,4285	0,8119
luokit.	4,9	2	1,8696	0,0308	2,5128

Taulukko 5.3.g. Tilastolliset analyysit haploryhmien vertailusta satunnaisesti (n=93) eturauhassyöpään sairastuneiden ja kontrollinäytteiden (n=400) kesken.

Haploryhmä	p / satunnais	p / kontrolli	Z	P (Z> z)	OR-arvo
H	40,9	45,5	-0,8108	0,2087	0,8276
V	5,4	5	0,1490	0,4408	1,0795
pre*HV	0	0	0	0	4,2834
HV*	0	1	-0,9683	0,1664	0,4712
pre*V	0	1,5	-1,1884	0,1173	0,3246
U	24,7	21,25	0,7311	0,2324	1,2176
K	3,2	4,75	-0,6412	0,2607	0,6684
UK*	2,2	2,75	-0,3250	0,3726	0,7772
T	6,5	4,25	0,9068	0,1822	1,5538
J	4,3	7	-0,9516	0,1706	0,5971
TJ*	1,1	0	2,0760	0,0189	12,9892
W	3,2	1,75	0,9094	0,1816	1,8714
X	1,1	1,5	-0,3118	0,3776	0,7138
I	4,3	0,5	3,0114	0,0013	8,9438
N*	1,1	0,5	0,6426	0,2603	2,163
muut	0	0,75	-0,8377	0,2011	0,6073
luokit.	2,2	2	0,0928	0,4630	1,0769

Taulukko 5.3.h. Tilastolliset analyysit haploryhmien vertailusta kaikkien syöpänäytteiden ja kontrollien (n=400) kesken.

Haploryhmä	p / syöpäiset (n=257)	p / kontrolli	Z	P (Z> z)	OR-arvo
H	36,6	45,5	-2,2617	0,0119	0,6908
V	5,1	5	0,0334	0,4867	1,0123
pre*HV	0,4	0	1,2485	0,1059	4,6842
HV*	0,8	1	-0,2916	0,3853	0,7765
pre*V	0,4	1,5	-1,3535	0,0879	0,2565
U	24,1	21,25	0,8628	0,1941	1,1783
K	5,8	4,75	0,6136	0,2698	1,2429
UK*	2,3	2,75	-0,3273	0,3717	0,8453
T	6,6	4,25	1,3353	0,0909	1,5958
J	5,4	7	-0,7939	0,2136	0,7654
TJ*	1,6	0	2,5028	0,0062	14,2189
W	1,9	1,75	0,1826	0,4275	1,1139
X	1,2	1,5	-0,3580	0,3602	0,7756
I	3,1	0,5	2,6696	0,0038	6,3936
N*	0,4	0,5	-0,2058	0,4185	0,7773
muut	0,4	0,75	-0,5803	0,2808	0,5149
luokit.	3,9	2	1,4491	0,0737	1,9838

Taulukoihin (5.3.a–5.3.h) on merkitty lihavoidulla fontilla ne P-arvot, jotka olivat tuloksissa tarpeeksi pieniä tilastollisen merkitsevyyden kannalta. Jotta tulosta tietyn haploryhmän sidonnaisuudesta eturauhassyöpään voitaisiin pitää tilastollisesti merkitsevä, oli P-arvon saavutettava 0,05:ttä pienempi arvo. Tilastollisten analyysien jälkeen haploryhmistä esiin nousivat I ja TJ* toisin kuin oli odotettavissa aiemmin tehdyn tutkimuksen mukaan (Booker ym., 2006). I- ja TJ*-haploryhmät nousivat P-arvojen perusteella esiin kaikissa kolmessa tapauksessa eli perhetaustaisten ja satunnaisesti eturauhassyöpään sairastuneiden sekä kaikkien syöpäisten (n=257) näytteitä verrattaessa kontrolleihin. Booker ym. 2006 tekivät tutkimuksissaan havainnon haploryhmä U:n roolista riskitekijänä (Fisherin exact testi $p = 0.019$) eturauhassyöpässä OR-arvon ollessa 1,95. Tässä tutkimuksessa haploryhmä U:n kohdalla P-arvo ei saavuttanut $<0,05$, joten merkitsevyydeltään sitä ei voida tuloksissa huomioida. Pelkästään perhetaustaisia eturauhassyöpänäytteitä verrattaessa kontrolleihin esiin nousivat tilastollisten analyysien jälkeen haploryhmien I ja TJ* lisäksi myös haploryhmät H ja ”luokittelemattomat”. Kun verrattiin kontrolleihin kaikkia

tutkimuksessa käytettyjä eturauhassyöpätapauksia (n=257) <0,05 P-arvo saavutettiin I- ja TJ*-haploryhmien lisäksi haploryhmässä H.

Näiden suomalaisissa näytteissä havaittujen tulosten ja analyysien perusteella voidaan tulkita, että haploryhmät I ja TJ* ovat eturauhassyövän riskitekijöitä, kun taas haploryhmä H olisi potentiaalinen suojaava tekijä eturauhassyöpää vastaan. On kuitenkin selvää, että lisää tutkimuksia tarvitaan selkiyttämään haploryhmien roolia eturauhassyövän riski-/suojaavuustekijöinä ennen kuin mitään varmaa tuloksista voidaan sanoa. Perhetaustaisia syöpänäytteitä verrattaessa kontroleihin esiin nousi myös ryhmä ”luokittelemattomat”, mikä viittaisi siihen, että myös tuohon ryhmään kuuluvilla olisi suurentunut riski altistua eturauhassyöväälle. On kuitenkin muistettava, että toistuvat mutaatiot ja mahdolliset takaisinmutaatiot korkeasti vaihtelevalla D-loop-alueella ovat mahdollisia syitä haploryhmän määrittämisen epäonnistumiseen, joten tällöin tätä tulosta ei voida ottaa tässä työssä huomioon.

Eroista perhetaustaisten ja satunnaisesti valittujen eturauhassyöpään sairastuneiden miesten välille ei saatu tilastollisesti merkitseviä, joten tulosten perusteella voidaan olettaa, että suomalaisväestössä näissä ryhmissä ei ole niin suuria eroja. Voi myös olla, että tässä työssä tehdyillä kokeilla ei eroja saatu nousemaan esiin perinnöllisesti ja satunnaisesti eturauhassyöpään sairastuneiden miesten kesken. Kokeissa käytetyt melko pienet näytemäärät saattavat olla yksi syy siihen, ettei haploryhmissä havaittu eroja perinnöllisesti ja satunnaisesti eturauhassyöpään sairastuneiden miesten välillä.

5.4 Sekvensoitaessa löytnyt muutoskohta C7996A

Haploryhmämäärittämissä varten tehdyissä sekvensoinneissa näytteistä löytyi muutoskohta C7996A, joka saa aikaan asparagiinihapon muuttumisen glutamiinihapoksi. Löydetty muutoskohta sijaitsee sytokromioksidaasi alayksikkö-II (COII)-geenin alueella. Tämä muutos löytyi kaikista niin syöpä- kuin kontrollinäytteistäkin niiltä osin kuin kyseiseltä kohdalta oli luettavaa sekvenssiä olemassa. Syöpänäytteiden kohdalla muutamista näytteistä ei saatu kunnan sekvenssiä tältä kohdalta, joten niiden osalta muutosta C7996A ei voitu varmistaa. Havaittujen

tulosten perusteella voidaan siis olettaa, että löydetty muutoskohta C7996A olisi erityisesti suomalaisessa väestössä esiintyvä mutaatio, koska siitä ei ole aikaisempaa raportointia maailmalta olemassa.

6 POHDINTA

Tässä osiossa otan huomioon tutkimuksessa tehtyjen työvaiheiden suorittamisen ja mahdolliset tässä työssä tuloksiin vaikuttaneet seikat. Samalla pohdin myös muiden tutkimusten valossa saatuja tietoja, jotka voidaan liittää tähän tutkimukseen tai, jotka mahdollisesti selittävät tästä tutkimuksesta saatuja tuloksia.

6.1 Tutkimuksen eri työvaiheista

Luotettavien tulosten saamiseksi tällaiset mtDNA:han liittyvät tutkimukset tulisi aina toteuttaa kahdella eri populaatiolla, jossa tutkittavien potilaiden sekä kontrollien määrä olisi satoja, jopa tuhansia (Herrnstadt & Howell, 2004). Tässä työssä suoritettiin kaikkien syöpänäytteiden (n=257) sekvensointi ja niiden osalta haploryhmien määrittäminen. Kontrollinäytteitä ei tarvinnut tässä tutkimuksessa lainkaan sekvensoida, koska näiden 400 näytteen haploryhmät oli määritetty sekvensoinnilla ja SNP:llä (single nucleotide polymorphism) jo ennalta Minkkisen (2006) toimesta hänen tutkimustaan ”Mitochondrial DNA mutations in age-related hearing impairment” varten. Kontrollipotilaiden kohdalla näyttemäärä oli suurin. Syöpäpotilaiden kohdalla suurempi näyttemäärä olisi voinut antaa toisenlaisen tuloksen, mutta tässä työssä käytettyjä näyttemääriäkin voidaan pitää tarpeeksi kattavina tulosten kannalta. Yhteensä syöpänäytteiden määrä oli kuitenkin satoja (n=257) kuten oli kontrollienkin kohdalla. Tämän työn kanssa samankaltainen tutkimus suoritettiin Booker ym. (2006) toimesta, joten voidaan katsoa, että tutkimus on suoritettu kahdella populaatiolla, sekä Yhdysvaltojen valkoihoisilla että suomalaisilla potilasnäytteillä.

PCR- ja sekvensointi- pipetoiteja tehdessä käsiteltiin aina vain yhtä näyteryhmää (perhetaustaiset vs. satunnaisesti sairastuneet) kerrallaan, millä voitiin välttää näytteiden mahdollinen sekoittuminen. Kuitenkin työskentely laboratorio-olosuhteissa käsittää aina pienen riskin kontaminaatiovaarasta riskien minimoinnista huolimatta, tällöin sitäkin mahdollisuutta ei voida täysin sulkea pois tutkimusta tehdessä. Myös sekvensointidatan käsittelyssä ja analysoinnissa on otettava huomioon virheen mahdollisuus, koska jokainen havaittu muutoskohta tarkistettiin manuaalisesti sekvenssin

elektroferogrammista, ja tarkastettavia näytteitä sekä siten muutoskohtia oli lukuisia. Myös noin puolessa haploryhmiä määrittävien polymorfioiden kohdalla näytteiden sekvenssit olivat osin huonoa, joten kaikista näytteistä ei ollut mahdollista tarkistaa muutosta molemmista DNA-säikeistä. Näiden sekvensointiin liittyvien ongelmien minimoimiseksi olisi tarvittu uusia sekvensointireaktioita ja niiden tarkastusta.

Tunnusomaista mtDNA:lle on korkea mutaationopeus, joka on koodaavalla alueella jopa yli kymmenkertaista tuman DNA:n mutaationopeuteen verrattuna. Näin korkea mutaationopeus lisää vastaavien identtisten mutaatioiden riskiä evoluutiopuun eri haaroissa. Saman mutaation läsnäolo eri haploryhmissä viittaa homoplasmiaksi kutsuttuun tilaan. Mutaatioiden kuumat pisteet (hot spots) – kohdat mitokondriaalisessa DNA:ssa, jossa mutaatiotapaukset ovat hyvin yleisiä ja tapahtuvat useita kertoja – lisäävät edelleen mutaationopeudesta johtuvaa ongelmaa (Piechota ym., 2004). Fylogeneettistä analyysiä käytetään yleisimpänä menettelytapana ihmisten mtDNA:n evoluutionopeuden arvioinnissa, mutta myös maternaalisten sukujuurten tutkimisessa. Tällä menettelytavalla on kuitenkin rajoituksensa. Erityisesti D-loop-alueella on hypervaihtelevia paikkoja, jotka sekoittavat tarkkaa arviointia puun topologiassa ja haarojen pituudessa (Howell ym., 1996). Kuten tiedetään, D-loop-alueella sijaitsee suuri osa haploryhmiä määrittävistä polymorfioista, jolloin korkea vaihtuvuus ja seuraukset yhtenevistä mutaatioista osaltaan hankaloittaa tutkimuksia. Täten tässäkin tutkimuksessa käytettynä menetelmä ei ole täysin aukoton ja hypervaihtelevilla alueilla olevat toistuvat mutaatiot ja mahdolliset takaisinmutaatiot saattavat häiritä tuloksia haploryhmiä määritettäessä. Sekvenssimuutokset mtDNA:ssa D-loop-aluetta lukuunottamatta ovat kehittyneet yleisesti ottaen tasaisesti ("clock-like" manner) mahdollistaen tarkemman mutaationopeuden mittauksen ja siten parantaen evoluutionaaristen tapahtumien ajan arvioimista (Ingman ym., 2000). Muutokset D-loop-alueen ulkopuolella noudattavat siis kutakuinkin samaa tasaista evoluutionopeutta ja ovat siten mahdollisimman luotettavia tämän tyyppisiin sekvensointitutkimuksiin.

6.2 Tässä työssä saatujen tulosten tarkastelua

Haploryhmän I esiin nousu eturauhassyövän riskitekijänä osoittautui mielenkiintoiseksi. Vaikka sairastuneissa oli lukumäärällisesti vähän haploryhmään I kuuluneita, kontrolleihin verrattuna prosentuaaliset erot olivat suuria. Haploryhmä I on siitakin syystä mielenkiintoinen, että se nousi esiin myös Minkkisen (2006) tutkimuksessa ”Mitochondrial DNA mutations in age-related hearing impairment”. Tuo tutkimus osoitti haploryhmän I esiintyvyyden olevan korkeampi ikähuonokuuloisuudesta kärsivillä potilailla kuin kontrolleissa (Minkkinen, 2006, julkaisematon tulos). Koska eturauhassyöpää esiintyy normaalisti vanhemmilla miehillä, myös eturauhassyöpäpotilaitamme tutkittiin saatujen kliinisten tietojen pohjalta mahdollisia ikähuonokuuloisuusoireita. Oireita löytyi ainoastaan yhdeltä syöpäpotilaalta kahdeksasta. Eturauhassyövän ja ikähuonokuuloisuuden yhteisvaikutusta olisi mielenkiintoista tutkia suuremmilla potilasmäärillä, jotta saataisiin enemmän tietoa näiden kahden sairauden välisestä yhteydestä ja haploryhmän I roolista molempien tautien riskitekijänä.

Bookerin ym. (2006) tekemän tutkimuksen valossa oli odotettavissa, että haploryhmä U olisi noussut riskitekijäksi eturauhassyövän synnylle, näin ei kuitenkaan tässä työssä käynyt. Haploryhmän U havaittiin olevan kuitenkin selkeästi yleisempi syöpäpotilaissa, sekä perhetaustaista että satunnaista eturauhassyöpää sairastavilla, verrattuna kontrollipotilaisiin. Merkitsevyyksiltään erot eivät kuitenkaan saavuttaneet haluttua P-arvoa. Voisiko haploryhmän U yleisyys suomalaisessa väestössä olla yksi selittävistä tekijöistä, miksi haploryhmä U ei merkitsevyydeltään noussut esiin tässä tutkimuksessa? Kun tiedetään, että haploryhmä U esiintyy noin kolminkertaisena suomalaisilla verrattuna muihin eurooppalaisiin (Finnilä ym., 2000), oli haploryhmän U yleisyys myös kontrollipotilailla tässä tutkimuksessa korkeaa. Ei tosin olisi ensimmäinen kerta kun tutkimukset haploryhmien alttiudesta sairauksissa eroavat toisistaan. van der Walt ym. (2004) raportoivat tutkimuksessaan haploryhmän U olevan altistavassa yhteydessä Alzheimerin tautiin sukupuoli-spesifisesti, kun aiempi tutkimus taas oli havainnut haploryhmän K olevan riskiä alentava tekijä Alzheimerin tautiin sairastumisessa.

Haploryhmän H esiintymistiheyden (~40 %) tiedetään yleisesti olevan eurooppalaisessa väestössä korkeaa (Torroni ym., 1996). Tässä tutkimuksessa se nousi eturauhassyövän suhteen potentiaalisesti suojaavaksi tekijäksi. Kuitenkin vain osa miehistä sairastuu elämänsä aikana eturauhassyöpään, siten ehkä haploryhmän H yleisyys ja sen yhteys eturauhassyövän suhteen suojaavana tekijänä voitaneen selittää.

Työssä esiin nousivat myös haploryhmät TJ* sekä ”luokittelemattomat”, jotka eivät sinänsä sisälly haploryhmäluokitukseen vaan ne otettiin mukaan tuloksiin, koska niiden ajateltiin tarjoavan mielenkiintoisia näkökulmia tutkimuksen tulosten analysointiin. TJ*-haploryhmään luokiteltiin siis näytteet, jotka eivät linkkautuneet haploryhmiin T tai J, mutta haploklusteriin TJ näytteet saatiin yhdistettyä. Kun siis mtDNA:sta löytyy muutos T16126C, mutta ei enää muita sen haaran polymorfioita, voidaan olettaa, että riski eturauhassyövän kehittymiselle on kasvanut. Kuitenkin tiedetään, että kyseinen T16126C-muutoskohta sijaitsee D-loop-alueella, jossa tunnetusti on korkea mutaationopeus, mikä saattaa vaikuttaa tuloksiin. Myös Macaulay & Richardsin fylogeneettisessä puussa (kuva 2.5.b) TJ-haploklusteria määrittävä polymorfiakohta (T16126C) on alleviivattu, mikä viittaa siinä kohdassa tapahtuvista toistuvista mutaatioista ja mahdollisista takaisinmutaatioista. Myös ”luokittelemattomat” -ryhmään kuuluvien altistunutta roolia eturauhassyövän kehityksessä voidaan pitää kyseenalaisena samoista syistä kuin TJ*-ryhmänkin kohdalla. ”Luokittelemattomien” näytteiden kohdalla kyse voi olla mtDNA-näytteestä, jonka sekvenssiin on sattunut runsaasti toistuvia mutaatioita tai takaisinmutaatioita, jolloin haploryhmän määrittäminen voi olla mahdotonta.

Sekvensoinnin myötä löytyi myös muutoskohta C7996A, joka muuttaa COII:ssa asparagiinihapon glutamiinihapoksi. Mutaatiokohdan löytyminen myös tutkimuksessa käytetyistä suomalaisista kontrollinäytteistä osoittaa, että kyseessä on todennäköisesti suomalaisessa väestössä yleisesti esiintyvä mutaatio. Kyseisestä muutoksesta ei ole aiempaa raportointia ja siksi on mielenkiintoista, että kyseessä olisi yleinen ilmiö suomalaisessa väestössä. Tämän muutoskohdan tarkempi analysointi vaatisi lisätutkimuksia toisesta populaatiosta, jotta voitaisiin selvittää sen uniikkiyhteys suomalaisiin.

Homoplasmiset mtDNA:n polymorfiat esiintyvät melko tavallisesti tiettyinä yhdistelminä. Tällaiset homoplasmiset, patogeeniset mtDNA:n mutaatiot voidaan usein yhdistää tiettyjen polymorfoiden kaavaan. Tämän tyyppisiä homoplasmisia yhdistelmiä nukleotidimuunnoksista pidetään evoluutiossa vanhoina. Sitä vastoin heteroplasmiset mutaatiot ovat evoluutiossa uusia ja ne saattavat esiintyä eri genotyypeissä (Finnilä ym., 1999). Kaikki tässä tutkimuksessa havaitut muutokset olivat homoplasmisia, siltä osin kun luettavaa sekvenssiä oli molempiin suuntiin saatavilla. On muistettava, ettei noin puolille tapauksista ollut saatavilla luettavaa sekvenssiä kuin näytteen toisesta suunnasta, joten näiden kohdalla heteroplasmian mahdollisuutta ei voida rajata pois. Hetero/homoplasmialla ei ole vaikutusta tässä työssä pääosassa olevan haploryhmämäärityksen tuloksiin. Tutkimuksessa löydetty, ilmeisesti suomalaisväestön normaaliin mtDNA-sekvenssiin kuuluva, muutos C7996A havaittiin alukeparilla mt 7981 & mt 8305 monistettuna ja sekvensoituna. Kyseinen muutos kuitenkin sijaitti alukeparilla monistettavan sekvenssin niin alkupäässä, ettei mtDNA:sta ollut mahdollista saada luettavaa sekvenssiä kuin yhteen suuntaan, täten homo-/heteroplasmia muutoksen C7996A kohdalla jäi avoimeksi.

6.3 Eturauhassyöpään liitetyn mtDNA-tutkimuksen tulevaisuus

Tätä tutkimusta kirjoitettaessa ei muita vastaavia eturauhassyöpän ja haploryhmäsidonnaisuuden välisiä tutkimuksia ollut julkaistu Bookerin ym. (2006) tekemän tutkimuksen lisäksi, joten se on ainoa vertailukohde. Tiedetään, että Pohjois-Amerikan valkoihoiset kuuluvat eurooppalaisen alkuperänsä vuoksi samoihin yhdeksään haploryhmään: H, I, J, K, T, U, V, W ja X kuin suomalaisetkin. Haploryhmien vuoksi nämä kaksi tutkimusta ovatkin hyvin toisiinsa verrattavia. Kuitenkin muitakin tutkimuksia tarvitaan, jotta saataisiin tietoa onko eri väestöissä erilaiset taipumukset haploryhmien osuudessa eturauhassyöpään liittyvää sidonnaisuutta tutkittaessa.

Koska mitokondriot säätelevät apoptoosia ja niiden tiedetään olevan vastuussa vapaiden happiradikaalien tuotannosta, on perusteltua, että mitokondriot voitaisiin liittää myös karsinogeneesiin. Täten mitokondriaalisten haploryhmien ja eturauhassyöpän välisen

yhteyden tutkiminen on järkeenkäypää (Brooks, 2006). Aiemmin julkaistuun Bookerin ym. (2006) tekemään tutkimukseen eturauhassyövän ja haploryhmien välisestä yhteydestä liittyy myös epäkohtia, joihin tulee kiinnittää huomiota tätä tutkimusta tarkasteltaessa. Tiedetään, että Yhdysvaltojen valkoihoiset ovat geneettisesti erittäin heterogeeninen väestö, minkä vuoksi ei ole takeita, että Bookerin ym. (2006) tutkimuksessa käyttämien kahden ryhmän (potilaat vs. kontrollit) väliltä ei löytyisi etnisiä eroja mtDNA:n haplotyypeissä. Täten näiden kahden ryhmän etniset erot voivat johtaa väärin tulkittuun tulokseen (Brooks, 2006). Siksi tämä suomalaisväestöllä tehty tutkimus antaa uuden näkökulman eturauhassyövän ja haploryhmien välisestä yhteydestä, kun tiedetään suomalaisten olevan geneettisesti hyvin homogeeninen kansa. Myös samantapaiset tutkimukset muilla geneettisesti homogeenisillä kansoilla antaisi uutta tietoa haploryhmien roolista eturauhassyövässä.

Oli eturauhassyöväälle altistava haploryhmä mikä tahansa, tuskin voidaan sanoa, että tietyllä haploryhmällä yksinään olisi vaikutusta eturauhassyövän synnyn kanssa. Koska on olemassa todisteita siitä, että tietyt yhdistelmät muutoin harmittomina tunnetuista polymorfioista mitokondriaalisissa sukujuurissa olisivat alttiutena erilaisille sairauksille (Chinnery ym., 2000; Ruiz-Pezini ym., 2000; Wallace ym., 1999), voidaan olettaa, että tietyt haploryhmiin yhdistetyt polymorfiat yhdessä muiden mtDNA:n polymorfioiden kanssa vaikuttaisivat riskitekijän roolissa eturauhassyövässä. Täten kuulumalla tiettyyn haploryhmään, nousisi alttius sairastua eturauhassyöpään, jos mtDNA:ssa olevat muut polymorfiat reagoisivat haitallisesti haploryhmiä määrittävien polymorfioiden kanssa. Toinen yhtä todennäköinen selitys haploryhmien roolista eturauhassyövän aiheuttajana olisi, että mtDNA:n haploryhmä on ns. sijaismerkki ituradassa oleville muille tuman DNA:n muutoksille, jotka altistavat eturauhassyöväälle (Brooks, 2006). Näiden oletusten valossa lisätutkimukset sekä mtDNA:n että sen polymorfioiden ja tuman DNA:n yhteyksistä olisivat paikallaan, kun halutaan selvittää haploryhmien todellista roolia eturauhassyövän riskitekijänä.

Kun tiedetään, että eturauhassyöpä on pääasiallisesti iäkkäämpien (puhkeaa yleensä yli 70 vuoden iässä) miesten tauti (www.eturauhassyopa.info, 2008) ja, että vanhetessa nimenomaan mtDNA:n mutaatiot kasaantuvat (Wallace ym., 2006), on tärkeää

jatkossakin tutkia näiden kahden ilmiön välistä yhteyttä. Kaikkiaan tämä tutkimus tarjoaa oivan lähtökohdan lisätutkimuksille mitokondriaalisen DNA:n ja eturauhassyövän välisistä yhteyksistä. Yksi selvä epäkohta tässä työssä oli käytettyjen kontrollien ja syöpäpotilaiden näytteiden väliset erot, jotka ovat saattaneet vaikuttaa tuloksiin. Kuten tiedetään, eturauhassyöpänäytteet ovat luonnollisesti kaikki miehiltä saatuja, kun taas työssä käytetyissä kontrolleissa oli sekä miesten että naisten näytteitä. Onkin syytä miettiä voisiko tulos olla toinen, jos kontrollit olisivat olleet pelkästään miehiltä saatuja näytteitä? Tähän kysymykseen etsitään vastausta tulevissa tutkimuksissa sekvensoimalla lisää pelkästään miehiltä saatuja kontrollinäytteitä. Tarkoituksena onkin seuraavaksi tämän tutkimuksen pohjalta laajentaa tutkimuskenttää ja selvittää tässä työssä mahdollisia avoimeksi/epäselviksi jääneitä kohtia mm. suurempien näytemäärien ja kattavampien sekvensointien myötä.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksella oli tarkoitus selvittää voidaanko suomalaisten eturauhassyöpää joko perhetaustaisesti tai satunnaisesti sairastavien miesten joukosta löytää yhteistä mitokondriaalista haploryhmä -riskitekijää. Tarkoituksena oli myös tutkia löytykö eturauhassyöpään perhetaustaisesti ja satunnaisesti sairastuneiden väliltä eroja mitokondriaalisissa haploryhmissä.

Suomalaisten eturauhassyöpää sairastavien miesten näytteiden perusteella ja tämän tutkimuksen pohjalta ei voida tukea Yhdysvalloissa valkoihoisilla tehtyä tutkimusta, jossa haploryhmän U ja eturauhassyövän kehittymisen välille löydettiin yhteys (Booker ym., 2006). Suomalaisesta väestöstä eturauhassyöpään sairastuneilta miehiltä esiin nousivat mitokondriaalisia haploryhmiä tutkittaessa ryhmät H, I ja TJ*. Tulosten perusteella voidaan siis päätellä, että näistä ryhmistä kahdella, I ja TJ* olisi vaikutusta eturauhassyövän kehittymisen kannalta. Toisin sanoen ryhmiä I ja TJ* voidaan pitää riskitekijöinä eturauhassyövän kehittymiselle riippumatta onko miehellä positiivista perhetaustaa eturauhassyöväälle vai ei. Kun taas tulosten perusteella haploryhmän H voidaan olettaa olevan potentiaalinen suojaava tekijä eturauhassyöpää vastaan, etenkin eturauhassyövässä perhetaustaisesti positiivisten miesten kohdalla.

Eturauhassyöpään perhetaustaisesti tai satunnaisesti sairastuneiden miesten välille ei löydetty tässä tutkimuksessa mitokondriaalisia haploryhmiä verrattaessa merkittäviä eroja. Voidaan siis olettaa, että jakaumat mitokondriaalisten haploryhmien kesken ovat samansuuntaiset riippumatta sairastuuko eturauhassyöpään satunnaisesti vai perhetaustan vuoksi.

Tässä työssä sekvensointia tehdessä löytynyt muutoskohta C7996A on tutkimuksessa käytettyjen näytteiden perusteella suomalaisessa väestössä yleisesti esiintyvä mutaatio, joka muuttaa geenissä COII arparagiinihapon glutamiinihapoksi. Koska mutaatio löytyi kaikista kontrollinäytteistäkin, ei ainoastaan eturauhassyöpää sairastavilta, voidaan olettaa, ettei kyseinen aminohappomuutos aiheuta kummempia häiriöitä sytokromioksidaasi II-alayksikön toiminnalle. Tämän tutkimuksen perusteella on jopa

oletettavaa, että itse asiassa muutos C7996A on osa normaalia sekvenssiä suomalaisten mtDNA:ssa.

On selvää, että lisätutkimukset ovat paikallaan haploryhmien altistavasta ja suojaavasta vaikutuksesta yhteydessä eturauhassyöpään, etenkin kun tässä työssä saadut tulokset eroavat aikaisemmin raportoidusta, joskin eri populaatiolla tehdystä, tutkimuksesta (Booker ym., 2006). Mahdollisesti suuremmat näytemäärät antaisivat tutkimukselle lisäarvoa. Myös muutoskohdan C7996A löytyminen ja sen mahdollisesti aiheuttamat vaikutukset vaativat erityistä lisätarkastelua, koska sen löytyminen nimenomaan suomalaisesta väestöstä geneettisen homogeenisuuden takia on mielenkiintoista. Olisi kiinnostavaa tietää löytyykö kyseistä muutosta myös muista väestöistä vai onko se suomalaisen geeniperimän erityistapaus.

LÄHDELUETTELO

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Energy generation in mitochondria and chloroplasts. *Essential cell biology*, second edition. Garland science publishing 2004; 455.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Energy conversion: Mitochondria and chloroplasts. *Molecular biology of the cell*, fourth edition. Garland science publishing 2002; 808–820.

Andrews R. M., Kubacka I., Chinnery P. F., Lightowlers R. N., Turnbull D. M., Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 1999; 23:147.

Baker S. G., Lichtenstein P., Kaprio J., Holm N. Genetic susceptibility to prostate, breast and colorectal cancer among nordic twins. *Biometrics* 2005; 61:55–63.

Booker L. M., Habermacher G. M., Jessie B. C., Sun Q. C., Baumann A. K., Amin M., Lim S. D., Fernandez-Golarz C., Lyles R. H., Brown M. D., Marshall F. F., Petros J. A. North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer. *The journal of urology* 2006; 175:468–473.

Brandon M., Baldi P., Wallace D. C. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 2006; 25:4647–4662. Review.

Brooks J. D. Editorial comment artikkelissa Booker L. M., Habermacher G. M., Jessie B. C., Sun Q. C., Baumann A. K., Amin M., Lim S. D., Fernandez-Golarz C., Lyles R. H., Brown M. D., Marshall F. F., Petros J. A. North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer. *The journal of urology* 2006; 175:468–473.

Carew J. S. & Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Molecular cancer* 2002; 9:1:9. Review.

Carter B. S., Beaty T. H., Steinberg G. D., Childs B., Walsh P. C. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Genetics* 1992; 89:3367–3371.

Chatterjee A., Mambo E., Sidransky D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene* 2006; 25:4663–4674.

Chen J. Z., Godken N., Greene G. F., Greene B., Kadlubar F. F. Simultaneous generation of multiple mitochondrial DNA mutations in human prostate tumors suggests mitochondrial hyper-mutagenesis. *Carcinogenesis* 2003; 24(9):1481–1487.

Chen J. Z., Gokden N., Greene G. F., Mukunyadzi P., Kadlubar F. F. Extensive somatic mitochondrial mutations in primary prostate cancer using laser capture microdissection. *Cancer research* 2002; 62:6470–6474. *Advances in brief*.

Chinnery P. F., Howell N., Andrews R. M., Turnbull D. M. Mitochondrial DNA analysis: polymorphisms and pathogenicity. *Med. Genet.* 1999; 36:505–510. Review.

Chinnery P. F., Taylor G. A., Howell N., Andrews R. M., Morris C. M., Taylor R. W., McKeith I. G., Perry R. H., Edwardson J. A., Turnbull D. M. Mitochondrial DNA haplogroups and susceptibility to AD and dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2000; 55:302–304.

Dakubo G. D., Parr R. L., Costello L. C., Franklin R. B., Thayer R. E. Altered metabolism and mitochondrial genome in prostate cancer. *J. Clin. Pathol.* 2006; 59:10–16.

De Benedictis G., Carrieri G., Varcasia O., Bonafé M., Franceschi C. Inherited variability of the mitochondrial genome and successful aging in humans. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 908:208–218.

De Benedictis G., Rose G., Carrieri G., De Luca M., Falcone E., Passarino G., Bonafé M., Monti D., Baggio G., Bertolini S., Mari D., Mattace R., Franceschi C. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J* 1999; 13(12):1532–1536.

Dong J-T. Prevalent mutations in prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006; 97:433–447.

Fernández-Silva P., Enriquez J. A., Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental Physiology* 2003; 88(1):41–56. Review.

Finnilä S., Hassinen I. E., Ala-Kokko L., Majamaa K. Phylogenetic network of the mtDNA haplogroup U in Northern Finland based on sequence analysis of the complete coding region by conformation-sensitive gel electrophoresis. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 66:1017–1026.

Finnilä S., Hassinen I. E., Majamaa K. Restriction fragment analysis as a source of error in detection of heteroplasmic mtDNA mutations. *Mutation Research Genomics* 1999; 406:109–114.

Finnilä S., Lehtonen M. S., Majamaa K. Phylogenetic network for European mtDNA. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 68:1475–1484.

Gallardo M. E., Moreno-Loshuertos R., López C., Casqueiro M., Silva J., Bonilla F., Rodríguez de Córdoba S., Enríquez J. A. m.6267G > A: A Recurrent mutation in the human mitochondrial DNA that reduces cytochrome C oxidase activity and is associated with tumors. *Human mutation* 2006; 27(6):575–582.

Galtier N., Enard D., Radondy Y., Bazin E., Belkhir K. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA. *Genome Res.* 2006; 16(2):215–222.

Giles R. E., Blanc H., Cann H. M., Wallace D. C. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Genetics* 1980; 77(11):6715–6719.

Gómez-Zaera M., Abril J., González L., Aguiló F., Condom E., Nadal M., Nunes V. Identification of somatic and germline mitochondrial DNA sequence variants in prostate cancer patients. *Mutation Research* 2006; 595:42–51.

Grönberg H., Bergh A., Damber J-E., Emanuelsson M. Cancer risk in families with hereditary prostate carcinoma-A possible link between prostate, breast, and gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 89(6):1315–1321.

Grönberg H., Xu J., Smith J. R., Carpten J. D., Isaacs S. D., Freije D., Bova S., Walsh P. C., Collins F.S., Trent J. M., Meyers D. A., Isaacs W. B. Early age at diagnosis in families providing evidence of linkage to the hereditary prostate cancer locus (HPC1) on chromosome 1. *Cancer research* 1997; 57:4707–4709. *Advances in brief*.

Heino J. & Vuento M. Solun rakenne ja evoluutio. *Solubiologia*. Werner Söderström Osakeyhtiö 2002; 78.

Heino J. & Vuento M. Solun aineenvaihdunta. *Solubiologia*. Werner Söderström Osakeyhtiö 2002; 80–97.

Herrnstadt C. & Howell N. An evolutionary perspective on pathogenic mtDNA mutations: haplogroup associations of clinical disorders. *Mitochondrion* 2004; 4:791–798.

Hockenbery D. M. A mitochondrial achilles' heel in cancer? *Cancer cell* 2002; 2(1):1–2.

Hofmann S., Jaksch M., Bezold R., Mertens S., Aholt S., Paprotta A., Gerbitz K-D. Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease. *Human Molecular Genetics* 1997; 6(11):1835–1846.

Howell N., Kubacka I., Mackey D. A. How rapidly does the human mitochondrial genome evolve? *Am. J. Hum. Genet.* 1996; 59:501–509.

Ingman M., Kaessmann H., Pääbo S., Gyllensten U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 2000; 408:708–713.

Jerónimo C., Nomoto S., Caballero O. L., Usadel H., Henrique R., Varzim G., Oliveira J., Lopes C., Fliss M. S., Sidransky D. Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. *Oncogene* 2001; 20:5195–5198.

Jessie B. C., Sun C. Q., Irons H. R., Marshall F. F., Wallace D. C., Petros J. A. Accumulation of mitochondrial DNA deletions in the malignant prostate of patients of different ages. *Experimental Gerontology* 2001; 37(1):169–174.

- Lichtenstein P., Holm N. V., Verkasalo P. K., Iliadou A., Kaprio J., Koskenvuo M., Pukkala E., Skytthe A., Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343(2):78–85.
- Lightowlers R. N., Chinnery P. F., Turnbull D. M., Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: hereditary, heteroplasmy and disease. *Trends Genet.* 1997; 13(11):450–455. Review.
- Lindström S., Zheng S. L., Wiklund F., Jonsson B-A., Adami H-O., Augustsson Bälter K., Brookes A. J., Sun J., Chang B-L., Liu W., Li G., Isaacs W. B., Adolfsson J., Grönberg H., Xu J. Systematic replication study of reported genetic association in prostate cancer: strong support for genetic variation in the androgen pathway. *Prostate* 2006; 66(16):1729–1743.
- Lukkarinen O., Ala-Opas M., Aro J., Elomaa I., Kylmä T., Laato M., Lammi U-K., Salo J. Eturauhassyövän hoito. Suomen Urologiyhdistys ry:n asettama hoitosuositusryhmä. Käypä Hoito -suositus. *Duodecim* 1999; 115(14):1508.
- Macaulay V., Richards M., Hickey E., Vega E., Cruciani F., Guida V., Scozzari R., Bonnè-Tamir B., Sykes B., Torroni A. The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 64:232–249.
- Matikainen M. P., Pukkala E., Schleutker J., Tammela T. L. J., Koivisto P., Sankila R., Kallioniemi O-P. Relatives of prostate cancer patients have an increased risk of prostate and stomach cancers: a population-based, cancer registry study in Finland. *Cancer causes and control* 2001; 12:223–230.
- McKenzie M., Liolitsa D., Hanna M. G. Mitochondrial disease: Mutations and mechanisms. *Neurochemical Research* 2004; 29(3):589–600.
- Meinilä M., Finnilä S., Majamaa K. Evidence for mtDNA admixture between the Finns and the Saami. *Hum Hered.* 2001; 52:160–170.
- Minkinen K. Mitochondrial DNA mutations in age-related hearing impairment. Master's thesis 2006.
- Mizumachi T., Muskhelishvili L., Naito A., Furusawa J., Fan C-Y., Siegel E. R., Kadlubar F. F., Kumar U., Higuchi M. Increased distributional variance on mitochondrial DNA content associated with prostate cancer cells as compared with normal prostate cells. *The Prostate* 2008; 68:408–417.
- Moilanen J. S., Majamaa K. Phylogenetic network and physicochemical properties of nonsynonymous mutations in the protein-coding genes of human mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 2003; 20(8):1195–1210.

Navaglia F., Basso D., Fogar P., Sperti C., Creco E., Zambon C-F., Stranges A., Falda A., Pizzi S., Parenti A., Pedrazzoli S., Plebani M. Mitochondrial DNA D-loop in pancreatic cancer-Somatic mutations are epiphenomena while the germline 16519T variant worsens metabolism and outcome. *Am. J. Clin. Pathol.* 2006; 126:593–601.

Nelson D. L. & Cox M. M. *Cells. Lehninger Principles of Biochemistry*, third edition. Worth Publishers, New York, 2000; 36–37.

Nelson D. L. & Cox M. M. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Lehninger Principles of Biochemistry*, third edition. Worth Publishers, New York, 2000; 688–689.

Niemi A-K., Hervonen A., Hurme M., Karhunen P. J., Jylhä M., Majamaa K. Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum Genet.* 2003; 112:29–33.

Nienstedt W., Hänninen O., Arstila A., Björkqvist S-E. *Solu. Ihmisen fysiologia ja anatomia. Werner Söderström Osakeyhtiö* 1999; 36.

Nienstedt W., Hänninen O., Arstila A., Björkqvist S-E. *Lisääntyminen. Ihmisen fysiologia ja anatomia. Werner Söderström Osakeyhtiö* 1999; 438.

Nishikawa M., Nishiguchi S., Shiomi S., Tamori A., Koh N., Takeda T., Kubo S., Hirohashi K., Kinoshita H., Sato E., Inoue M. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 2001; 61:1843–1845.

Pakkanen S., Baffoe-Bonnie A. G., Matikainen M. P., Koivisto P. A., Tammela T. L. J., Deshmukh S., Ou L., Bailey-Wilson J. E., Schleutker J. Segregation analysis of 1,546 prostate cancer families in Finland shows recessive inheritance. *Hum. Genet.* 2007; 121(2):257–267.

Parr R. L., Dakubo G. D., Grandall K. A., Maki J. Reguly B., Aguirre A., Wittock R., Robinson K., Alexander J. S., Birch-Machin M. A., Abdel-Malak M., Froberg M. K., Diamandis E. P., Thayer R. E. Somatic mitochondrial DNA mutations in prostate cancer and normal appearing adjacent glands in comparison to age-matched prostate samples without malignant histology. *Journal of Molecular Diagnostics* 2006; 8(3):312–319.

Petros J. A., Baumann A. K., Ruiz-Pesini E., Amin M. B., Sun C. Q., Hall J., Lim S., Issa M. M., Flanders W. D., Hosseini S. H., Marshall F. F., Wallace D. C. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *PNAS.* 2005; 102(3):719–724.

Piechota J., Tónska K., Nowak M., Kabzinska D., Lorenc A., Bartnik E. Comparison between the Polish population and European populations on the basis of mitochondrial morphs and haplogroups. *Acta Biochim Pol.* 2004; 51(4):883–895.

Potter S. R. & Partin A.W. Hereditary and familial prostate cancer: Biology aggressiveness and recurrence. *Reviews in Urology* 2000; 2(1):35–36. Reviewing the literature.

Richards M., Côté-Real H., Forster P., Macaulay V., Wilkinson-Herbots H., Demaine A., Papiha S., Hedges R., Bandelt H. J., Sykes B. Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am. J. Hum. Genet.* 1996; 59(1):185–203.

Richards M. B., Macaulay V. A., Bandelt H. J., Sykes B.C. Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann. Hum. Genet.* 1998; 62:241–260.

Richards M., Macaulay V., Hickey E., Vega E., Sykes B., Guida V., Rengo C., Sellitto D., Cruciani F., Kivisild T., Villems R., Thomas M., Rychkov S., Rychkov O., Rychkov Y., Gölge M., Dimitrov D., Hill E., Bradley D., Romano V., Cali F., Vona G., Demaine A., Papiha S., Triantaphyllidis C., Stefanescu G., Hatina J., Belledi M., Di Rienzo A., Novelletto A., Oppenheim A., Norby S., Al-Zaheri N., Santachiara-Benerecetti S., Scozzari R., Torroni A., Bandelt H-J. Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 67:1251–1276.

Ruiz-Pesini E., Lăpena A-C., Díez-Sánchez C., Pérez-Martos A., Montoya J., Alvarez E., Díaz M., Urriés A., Montoro L., López-Pérez M. J., Enríquez J. A. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 67:682–696.

Rökman A. In search of high-penetrant hereditary prostate cancer susceptibility genes in Finland. Academic dissertation. Tampereen Yliopistopaino Oy – Juvenes print 2004; 29.

Rökman A., Baffoe-Bonnie A. B., Gillanders E., Fredriksson H., Autio V., Ikonen T., Gibbs Jr K. D., Jones M., Gildea D., Freas-Lutz D., Markey C., Matikainen M. P., Koivisto P. A., Tammela T. L. J., Kallioniemi O-P., Trent J., Bailey-Wilson J. E., Schleutker J. Hereditary prostate cancer in Finland: Fine mapping validates 3p26 as a major predisposition locus. *Hum. Genet.* 2005; 116(1-2):43–50.

Rökman A., Ikonen T., Mononen N., Autio V., Matikainen M. P., Koivisto P. A., Tammela T. L. J., Kallioniemi O-P., Schleutker J. *ELAC2/HPC2* involvement in hereditary and sporadic prostate cancer. *Cancer research* 2001; 61:6038–6041. Advances in brief.

Saarela S., Biologiset rytmit. Vanhenemiseen vaikuttavia tekijöitä. *Studia generalia* 2000.

Saxena R., de Bakker P. I. W., Singer K., Mootha V., Burt N., Hirschhorn J. N., Gaudet D., Isomaa B., Daly M. J., Groop L., Ardlie K. G., Altshuler D. Comprehensive association testing of common mitochondrial DNA variation in metabolic disease. *The American Journal of Human Genetics* 2006; 79:54–61.

Schaid D. J. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Human molecular genetics* 2004; 13(1):R103–R121. Review.

Schwartz M. & Vissing J. No evidence for paternal inheritance of mtDNA in patients with sporadic mtDNA mutations. *Journal of the Neurological Sciences* 2004; 218:99–101.

Torrioni A., Huoponen K., Francalacci P., Petrozzi M., Morelli L., Scozzari R., Obinu D., Savontaus M-L., Wallace D. C. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 1996; 144:1835–1850.

Torrioni A., Lott M. T., Cabell M. F., Chen Y. S., Lavergne L., Wallace D. C. mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am. J. Hum. Genet.* 1994; 55(4):760–776.

Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M., Spelbrink J. N., Rovio A. T., Bruder C. E., Bohlooly-Y M., Gidlof S., Oldfors A., Wibom R., Törnell J., Jacobs H. T., Larsson N. G. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 2004; 429(6990):417–423.

van der Walt J. M., Dementieva Y. A., Martin E. R., Scott W. K., Nicodemus K. K., Kroner C. C., Welsh-Bohmer K. A., Saunders A. M., Roses A.D., Small G. W., Schmechel D. E., Doraiswamy P. M., Gilbert J. R., Haines J. L., Vance J. M., Pericak-Vance M. A. Analysis of European mitochondrial haplogroups with alzheimer disease risk. *Neuroscience Letters* 2004; 365:28–32.

Wallace D. C. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91:8739–8746.

Wallace D. C., Brown M. D., Lott M. T. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 1999; 238:211–230.

Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123(3191):309–314.

Xie C-h, Naito A., Mizumachi T., Evans T. T., Douglas M. G., Cooney G. A., Fan C-Y., Higuchi M. Mitochondrial regulation of cancer associated nuclear DNA methylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 364:656–661.

Xu J., Meyers, D., Freije D., Isaacs S., Wiley K., Nusskern D., Ewing C., Wilkens E., Bujnovszky P., Bova G. S., Walsh P., Isaacs W., Schleutker J., Matikainen M., Tammela T., Visakorpi T., Kallioniemi O-P., Berry R., Schaid D., French A., McDonnell S., Schroeder J., Blute M., Thibodeau S., Grönberg H., Emanuelsson M., Damber J-E., Bergh A., Jonsson B-A., Smith, J., Bailey-Wilson J., Carpten J., Stephan D., Gillanders E., Amundson I., Kainu T., Freas-Lutz D., Baffoe-Bonnie A., Van Aucken A., Sood R., Collins F., Brownstein M., Trent J. Evidence For prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nature Genetics* 1998; 20:175–179.

Zeviani M. & Antozzi C. Mitochondrial disorders. *Molecular Human Reproduction* 1997; 3(2):133–148. Review.